

# Az imidazolin receptorok gasztrointesztinális hatásainak farmakológiai analízise

Doktori értekezés

**Dr. Fehér Ágnes**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zádori Zoltán Sándor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Pethő Gábor, Ph.D., egyetemi tanár  
Dr. Török Tamás, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Müllner Katalin, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Zelena Dóra, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2018

## **TARTALOMJEGYZÉK**

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:.....	6
1. BEVEZETÉS.....	9
1.1. Általános bevezetés .....	9
1.2. Az alfa-2 adrenerg receptorok ( $\alpha_2$ -AR) .....	10
1.2.1. Az $\alpha_2$ -AR-k jelátviteli útvonala, szubtypusai és szervezeten belüli eloszlásuk .....	10
1.2.2. Az $\alpha_2$ -AR-k által mediált hatások.....	11
1.3. Az imidazolin hipotézis .....	12
1.4. Az imidazolin receptorok (IR) által képviselt jelátviteli útvonalak, szervezeten belüli eloszlásuk .....	13
1.4.1. Az I1R .....	13
1.4.2. Az I2R .....	14
1.4.3. Az I3R .....	15
1.5. Az IR-k által mediált hatások .....	16
1.5.1. Az I1R által közvetített hatások .....	16
1.5.2. Az I2R által közvetített hatások .....	17
1.6. Az endogén imidazolin ligandok.....	18
1.6.1. Az agmatin.....	18
1.6.2. A $\beta$ -carbolinok.....	20
1.6.3. Az imidazol-4-ecetsav ribotid (IAARP).....	21
1.7. Az imidazolin ligandok szerepe a GI rendszerben .....	22
1.7.1. Az imidazolin ligandok szerepe a gyomor nyálkahártya integritásának szabályozásában .....	22
1.7.2. Az imidazolin ligandok hatása a gyulladásos bélbetegség állatmodelljére..	26
1.7.3. Az IR-k és a motilitászavarok .....	28
2. CÉLKITŰZÉSEK: .....	31
2.1. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomor nyálkahártya integritásának szabályozásában.....	31
2.2. Az I1R-k és $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata colitisben.....	31

2.3. Az IIR-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában.....	31
3. MÓDSZEREK.....	32
3.1. Kísérleti állatok.....	32
3.2. Alkalmazott vegyületek.....	32
3.2.1. Szelektív $\alpha_2$ -AR ligandok.....	32
3.2.2. Az imidazolin rendszerre ható vegyületek .....	33
3.2.3. Vegyületek oldása .....	33
3.3. Vegyületek adagolási módjai.....	33
3.3.1. Intracerebroventrikuláris adagolás .....	33
3.3.2. Intraperitoneális és orális adagolás.....	34
3.4. In vivo kísérletek .....	34
3.4.1. Alkoholos fekély-modell .....	34
3.4.1.1. Gyomornyálkahártya léziók indukálása .....	35
3.4.1.2. Bilaterális cervikális vagotómia .....	35
3.4.1.3. A kísérlet ütemterve .....	35
3.4.1.4. Az eredmények kiértékelése.....	36
3.4.2. Dextrán-szulfát-nátrium (DSS) - indukálta colitis modell .....	37
3.4.2.1. A colitis indukálása .....	37
3.4.2.2. A vizsgált vegyületek adagolása és oldása .....	39
3.4.2.3. A DSS-indukálta colitis karakterizálása.....	39
3.4.2.4. Az IR és $\alpha_2$ -AR ligandok hatásának vizsgálata a DSS-colitisre.....	40
3.4.3. Lokomotoros aktivitás mérése.....	41
3.5. Ex vivo kísérletek .....	42
3.5.1. Elektromos téringerléssel (EFS) indukált gyomormotilitás mérés: a gyomorfundus kipreparálása .....	42
3.5.2. EFS-sel indukált gyomorkontrakciók regisztrálása.....	42
3.6. In vitro kísérletek.....	43
3.6.1. Gyomornyálkahártya CGRP és szomatosztatin szintjének meghatározása..	43
3.6.2. Colon disztális szakaszának szövettani analízise .....	43
3.6.3. Colon szöveti MPO szintjének meghatározása .....	44
3.6.4. Szérum IL-6 szintjének meghatározása.....	44

3.6.5. Colon szöveti citokinszintjének mérése .....	45
3.7. Statisztika.....	45
4. EREDMÉNYEK.....	46
4.1. Az IIR-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában.....	46
4.1.1. Az IIR-k és az I2R-k gasztroprotektív hatásának vizsgálata az endogén IR ligand agmatinnal .....	46
4.1.2. Az IR-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata az agmatin által kiváltott centrális gasztroprotekciónban .....	47
4.1.3. Az IIR-k és az I2R-k centrális gasztroprotektív hatásának vizsgálata szelektív IR ligandokkal .....	48
4.1.4. A nervus vagus és a perifériás faktorok szerepe az agmatin indukálta gyomornyálkahártya védelemben.....	49
4.2. Az IIR-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata DSS-indukálta colitis modellen	51
4.2.1. A DSS-indukálta colitis karakterizálása az imidazolin ligandokkal végzett kísérletekhez .....	51
4.2.2. Az IIR ligandok hatása a DSS által kiváltott colitisre .....	53
4.2.3. Az endogén imidazolin ligandok hatása a DSS-indukálta colitisre.....	57
4.2.4. A szintetikus IR ligandok hatása a DSS-indukálta colitisre, napi 2x adagolva .....	59
4.2.5. A DSS-oldat okozta gyulladás karakterizálása az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálatához használt colitis modellben.....	60
4.2.6. A clonidin hatása a DSS-indukálta colitis lefolyására WT egerekben.....	60
4.2.7. A clonidin hatása az étel- és vízfogyasztásra, illetve a lokomotoros aktivitásra WT egerekben.....	63
4.2.8. A clonidin hatása a DSS-indukálta colitisre $\alpha_2$ -AR szubtypus KO egerekben .....	65
4.2.9. A BRL 44408 hatása a DSS-indukálta colitisre WT egerek esetében.....	66
4.3. Az IIR-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában.....	69
4.3.1. Clonidin, moxonidin és rilmenidin hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra .....	69

4.3.2. Az $\alpha_2$ -AR és IR antagonisták hatása a clonidin, moxonidin és rilmenidin kontrakció gátló hatására .....	70
4.3.3. Az endogén IR ligand agmatin és a harman hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra .....	72
4.3.4. A 2-BFI hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra .....	74
5. MEGBESZÉLÉS .....	76
5.1. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában.....	76
5.2. Az I1R-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata colitisben .....	81
5.2.1. Különböző kevert $\alpha_2$ -AR/IR, szelektív I1R, illetve endogén IR ligandok hatásának vizsgálata a DSS-indukálta colitis modellben .....	81
5.2.2. Az $\alpha_2$ -AR-ok szerepének tisztázása a colitis patomechanizmusában.....	84
5.3. Az I1R-k és az I2R-k szerepének elemzése a fundus kontraktilitásának szabályozásában.....	89
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	95
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	97
8. SUMMARY .....	98
9. IRODALOMJEGYZÉK .....	99
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	126
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	128

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:**

<i>5-ASA:</i>	5-aminoszalicilsav
<i>5-HT:</i>	5-hidroxitriptamin / szerotonin
<i>ACh:</i>	acetyl-kolin
<i>ADC:</i>	arginin dekarboxiláz
<i>AGM:</i>	agmatin
<i>AGN:</i>	AGN 192403
<i>AR:</i>	adrenerg receptor / adrenoceptor
<i>BCA:</i>	bikinolinil dikarbonsav (bichinchonic acid)
<i>B-CK:</i>	agyi kreatinin-kináz
<i>BRL:</i>	BRL 44408
<i>cAMP:</i>	ciklikus adenzin-monofoszfát
<i>CCK:</i>	kolecisztokinin
<i>CDS:</i>	(clonidine displacing substance)
<i>CGRP:</i>	kalcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide)
<i>CLO:</i>	clonidin
<i>COX:</i>	ciklooxygenáz
<i>cPLA2:</i>	citoplazmatikus foszfolipáz A2
<i>CRF:</i>	kortikotropinfel szabadító hormon
<i>CXCL:</i>	kemokin (C-X-C) motif ligand
<i>DGBI:</i>	bél-idegrendszer zavarai (disorders of gut-brain interaction)
<i>DMNV:</i>	nervus vagus dorzális motoros magja (dorsal motor nucleus of vagus)
<i>DSS:</i>	dextrán-szulfát-nátrium (dextran sulphate sodium)
<i>DVC:</i>	dorzális vagus komplex
<i>EC50:</i>	50%-os hatást kiváltó koncentráció
<i>EFA:</i>	efaroxan
<i>EFS:</i>	elektromos téringelés (electric field stimulation)
<i>ELISA:</i>	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
<i>Emax:</i>	maximális hatás
<i>FD:</i>	funkcionális diszpepszia

<i>GI:</i>	gasztrointesztinális
<i>H2 receptor:</i>	hisztamin-2-receptor
<i>H2S:</i>	hidrogén-szulfid
<i>HAR:</i>	harman
<i>IAA-RP:</i>	imidazolecetsav ribotid
<i>IBD:</i>	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
<i>IBS:</i>	irritábilis bél szindróma
<i>i.c.:</i>	intracelluláris
<i>i.c.v.:</i>	intracerebroventriculáris
<i>IDA:</i>	idazoxan
<i>IFN:</i>	interferon
<i>IL:</i>	interleukin
<i>i.p.:</i>	intraperitoneális
<i>i.v.:</i>	intravénás
<i>IR:</i>	imidazolin receptor
<i>KIR:</i>	központi idegrendszer
<i>KO:</i>	génkiütött (knock-out)
<i>LNNA:</i>	N <sup>G</sup> -nitro-l-arginin
<i>MAO:</i>	monoamino-oxidáz
<i>MMP:</i>	mátrix metalloproteináz
<i>MOX:</i>	moxonidin
<i>NA:</i>	noradrenalin
<i>NO:</i>	nitrogén-monoxid
<i>NOS:</i>	nitrogén-monoxid szintáz
<i>NSAID:</i>	nem-szteroid gyulladáscsökkentő
<i>NTS:</i>	nucleus tractus solitarius
<i>PCR:</i>	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
<i>PG:</i>	prostaglandin
<i>PKC:</i>	protein kináz C
<i>PPAR-γ:</i>	peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor gamma
<i>PPI:</i>	protonpumpa gátló
<i>RIL:</i>	rilmenidin

<i>RVLM:</i>	rostrális ventrolateralis medulla
<i>SIP:</i>	szfingozin-1-foszfát
<i>SAL:</i>	fiziológiás sóoldat (saline)
<i>s.c.:</i>	szubkután
<i>SSAO:</i>	szemikarbazid-szenzitív amino-oxidáz
<i>Th sejt:</i>	T helper sejt
<i>TGF:</i>	transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
<i>TIMP:</i>	metalloproteináz szöveti gátlója (tissue inhibitor of metalloproteinase)
<i>TNBS:</i>	trinitrobenzénszulfonsav (trinitrobenzenesulfonic acid)
<i>TNF-<math>\alpha</math>:</i>	tumor nekrosis faktor alfa
<i>TRH:</i>	tireotropinfelszabadító hormon
<i>YOH:</i>	yohimbin
<i>VAG:</i>	vagotomia
<i>VEH:</i>	vehikulum
<i>VIP:</i>	vazoaktív intesztinális peptid



## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. Általános bevezetés**

Doktori disszertációmban az imidazolin receptor (IR) ligandok gasztrointesztinális (GI) traktusra kifejtett hatásait részletezem különböző állatmodellek (alkoholos fekély modell, kémiai úton indukált colitis modell, gyomorfundus kolinerg aktivitásának gátlása) segítségével. A három módszer egyrészt lehetőséget ad rá, hogy tanulmányozni tudjuk a gasztroprotekción/peptikus fekély és a gyulladásos bélbetegségek patomechanizmusának egy részét, illetve új potenciális terápiás célpontokat azonosítsunk az adott kórképek kezelésében.

A peptikus fekély gyógyításában úttörőnek bizonyultak a savszekréciót csökkentő gyógyszerek. A gasztroprotektív szerek alkalmazása háttérbe szorult a klinikumban, pedig számos esetben (pl. stressz-fekély) a savelválasztás gátlása nem hoz létre megfelelő gyógyulási válaszreakciót [1]. Gyulladásos bélbetegségek esetében is számos farmakológiai támadáspont áll rendelkezésre, viszont sok esetben a kapott hatás nem elégséges, a tünetek csupán mérséklődnek. Emellett számolni kell a gyógyszerek nem elhanyagolható mellékhatásaival, akárcsak a gyomor akkomodációs zavarai esetében. A felső tápcsatorna (jelen esetben gyomor) motilitászavarai egy komplex klinikai tünetegyüttes, melynek a hátterében számos oki tényező állhat, a kórkép farmakológiai kezelése a mai napig nem megoldott. A fent említetteknek megfelelően további kutatásokra van szükség új terápiás célpontok azonosítására.

Kutatócsoportunk az imidazolin ligandok hatásait vizsgálta a fenti kórképek állatmodelleiben. Ennek megfelelően a továbbiakban részletezem az imidazolin receptorok (IR) fajtáit, az általuk közvetített jelátviteli útvonalakat és hatásukat. Az imidazolin rendszer részletes ismertetése előtt azonban röviden kitérek az alfa-2 adrenerg receptorokra ( $\alpha_2$ -AR), ugyanis, amint azt a későbbiekben is részletezem, az IR-kat az  $\alpha_2$ -AR-k vizsgálata során fedezték fel, a két receptor csoport funkcionálisan szorosan kapcsolódik egymáshoz (ld. imidazolin hipotézis fejezet), továbbá az imidazolin ligandok többsége jelentős affinitással kötődik az  $\alpha_2$ -AR-khoz [2]. Ezért imidazolin hatás azonosításakor mindig ki kell zárni az  $\alpha_2$ -AR-k közvetítő szerepét, ezért kísérleteim során is legtöbbször párhuzamosan vizsgáltam a két receptor típust.

## **1.2. Az alfa-2 adrenerg receptorok ( $\alpha_2$ -AR)**

### **1.2.1. Az $\alpha_2$ -AR-k jelátviteli útvonala, szubtípusai és szervezetben belüli eloszlásuk**

Az  $\alpha_2$ -AR-k membránhoz kötött,  $G_i$  fehérjéhez kapcsolt receptorok, ahol az  $\alpha$ -alegység gátolja az adenilát-cikláz működését, ezáltal csökken az intracelluláris (i.c.) ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) szint. A  $\beta\gamma$ -komplex gátolja a kalcium csatornákat, aktiválja a GIRK kálium csatornákat és a mitogén-aktiválta protein kináz ERK 1/2-t [3]. Továbbá befolyásolja az exocitózisban részt vevő fehérjék működését [4], ezáltal csökken a sejt válaszadóképessége. 1979-ben publikálták először, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k nem csupán a preszinaptikus negatív feedback szabályozásában vesznek részt, hanem posztiszinaptikus elhelyezkedésben a vazokonstriktó kiváltásában is szerephez jutnak [5].

Az  $\alpha_2$  adrenoceptoroknak farmakológiai analízissel és molekuláris klónozással három szubtípusát különítették el: az  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  –AR-kat [6]. Patkányban leírtak egy negyedik szubtípust is ( $\alpha_{2D}$ -AR), viszont később kiderült, hogy ez az  $\alpha_{2A}$ -AR faji variánsa. A három szubtípus közül az  $\alpha_{2A}$ -AR szervezetben eloszlása a legszélesebb. A központi idegrendszerben (KIR) azonosították a locus coeruleusban [7], a rostrális ventrolateralis medullában (RVLM), a nervus vagus dorzális motoros magjában (DMNV), az agytörzs, az agykéreg, a septum, hypothalamus, hippocampus és az amygdala állományában is. Immunhisztokémiai analízissel további agyi régiókban (nucleus accumbens, substantia innominata, striatum fundus, lateralis parabrachialis nucleus, lateralis septum) is kimutatták jelenlétét [8].

Az  $\alpha_{2B}$ -AR-k szintén széleskörűen, de jóval kisebb denzitással fordulnak elő centrálisan, mint az  $\alpha_{2A}$ -AR-k [9]. Patkányban először a thalamusban írták le [7], majd kimutatták (prenatalis periódusban) az V., VII. agyidegekben, agykéregben, anterior olfactoricus neuronokban, hypothalamusban és a Purkinje sejtekben is [10].

Az  $\alpha_{2C}$ -AR-kat azonosították a basalis ganglionokban, a tuber olfactorián, a hippocampusban valamint a kéregállományban [7], továbbá kimutatták még a locus coeruleusban és a noradrenerg sejtekkel kapcsolatban álló agyi területeknél.

A gerincvelőben az  $\alpha_{2C}$ -AR a domináló szubtípus 80%-s előfordulással, amit az  $\alpha_{2A}$ -AR 20 %-s előfordulása követ. Az  $\alpha_{2B}$ -AR szubtípus itt elenyésző sűrűséggel figyelhető

csak meg [11, 12]. Az elmúlt években a periférián széleskörűen azonosították a különböző  $\alpha_2$ -AR szubtipusok mRNS-ét, viszont a receptor szubtipusok aránya eltér a KIR-hez viszonyítva (patkány esetében). A periférián az  $\alpha_{2A}$ -AR a predomináns, amit az  $\alpha_{2B}$ -AR követ és csupán csekély hányaddal képviselteti magát az  $\alpha_{2C}$ -AR [11].  $\alpha_{2A}$ -AR-kat azonosítottak emberi trombocitákon [13], vesében, valamint patkány gyomorban (ahol szintén az  $\alpha_{2A}$ -AR dominál), viszont a gyomorban és a vesében mind a három  $\alpha_2$ -AR szubtípus előfordul. Ezzel szemben pl. az aortában, lépben egyedül  $\alpha_{2A}$ -AR, míg a szívben és a májban csupán  $\alpha_{2B}$ -AR szubtípust írtak le [11]. Kiemelném, hogy az  $\alpha_2$ -AR-kat azonosították immunsejteken és többek között az enterocitákon is [14].

### **1.2.2. Az $\alpha_2$ -AR-k által mediált hatások**

A továbbiakban röviden összefoglalnám (a teljesség igénye nélkül) az  $\alpha_2$ -AR-k hatásait, különös figyelmet fordítva a disszertációm szempontjából fontos GI hatásokra.

Az  $\alpha_2$ -AR-k három szubtipusa közül az  $\alpha_{2A}$ -AR-k szerkezetbeli eloszlása, ennek megfelelően az általuk közvetített hatások köre a legszélesebb. Hatásai közül kiemelendő a vérnyomáscsökkentő (melyből az imidazolin hipotézis indult ki), bradikardizáló, szedatív hatása. Emellett csökkenti a testhőmérsékletet, stabilizálja a thrombust, növeli a térbeli munkamemóriát. Az  $\alpha_{2A}$ -AR az  $\alpha_{2B}$ -AR-hoz hasonlóan artériás vazokonstrikció kiváltására képes, valamint akárcsak az  $\alpha_{2C}$ -AR, jótékony hatású a figyelemhiányos hiperaktivitási zavarban. Emellett az  $\alpha_{2C}$ -AR szubtípus fő szerepet játszik a vénás vazokonstrikcióban, habár hipotermizáló hatását is leírták. Továbbá mind a három receptor szubtípus részt vesz a preszinaptikus transzmitterfelszabadulás gátlásában, valamint a fájdalomcsillapításban is [15].

Az  $\alpha_2$ -AR-k GI traktusban betöltött szerepe régóta kutatások tárgyát képezi. Már 1969-ben Paton és Vizi tengerimalac ileumon kimutatták, hogy a noradrenalin (NA) képes preszinaptikus  $\alpha_2$ -adrenoceptorokon keresztül gátolni az acetil-kolin (ACh) felszabadulását [16]. Ezt követően robbanásszerűen elindult az  $\alpha_2$ -AR-k, illetve azok szubtipusai által közvetített hatások azonosítása. A három szubtípus közül az  $\alpha_{2A}$ -AR-khoz köthető a centrális gyomorsavszekréció csökkentése [17] mellett a gyomormotilitás, gyomorürülés gátlása [18, 19]. Viszont a centrális gasztroprotekción az  $\alpha_{2B/C}$ -AR-k játszanak szerepet [20, 21]. Az intesztinális hatásokat tovább elemezve, az  $\alpha_2$ -AR-k

egyaránt megtalálhatók az enterális neuronokon, továbbá az enterocitákon és a simaizomsejteken is, ezáltal részt vesznek a neurotransmisszióban, a motilitás szabályozásában, a folyadéktranszportban, illetve a visceralis érzékelésben egyaránt. Erre példa, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k aktiválódása gátolja a vékonybélben a motilitást (melyben centrális komponens is részt vesz) [22], illetve az iontranszportot és a folyadékszekréciót [23]. Továbbá csökkenti a vastagbél motilitását és gátolja a székletürítést [24]. A kevert  $\alpha_2$ -AR/ $11R$  agonista clonidin irritábilis bél szindrómás (IBS) betegek esetében csökkentette a puffadás érzetét [25, 26]. Emellett kiemelném, hogy a bélrendszer immunsejtjein (monocita, makrofág) nagy számban expresszálódnak  $\alpha_2$ -AR-k [27], aktivációjuk befolyásolja a gyulladásos citokinek termelődését, ezáltal szereppel bírhatnak különféle gyulladásos kórképek kezelésében.

### **1.3. Az imidazolin hipotézis**

Az imidazolin hipotézis alapját képezi, hogy az  $\alpha_2$ -AR agonista clonidin centrális vérnyomáscsökkentő hatását nem csupán  $\alpha_2$ -AR-k aktiválásán keresztül fejt ki. Ruffolo és mtsai vetették fel először, hogy a preszinaptikus  $\alpha_2$ -AR-k szerkezete nem homogén, egyik részük a feniletilamin, másik részük az imidazolin struktúrát ismeri fel a kérdéses vegyületeknél [28]. Ezt a nézetet támasztja alá, hogy az imidazolin-gyűrűvel rendelkező  $\alpha_1$ -AR antagonistá fentolamin direkt injekciója a IV. agykamrába jelentős vérnyomáscsökkenést képes létrehozni [29]. Ezt követően 1984-ben Bousquet és munkatársai adtak hangot az imidazolin hipotézisnek azzal a megfigyeléssel, hogy a szintén imidazolin-gyűrűvel rendelkező cirazolin ( $\alpha_1$ -AR agonista / $\alpha_2$ -AR antagonistá) az RVLN nucleus reticularisába fecskendezve hipotenzív hatást fejtett ki, viszont a szelektív  $\alpha_2$ -AR agonista  $\alpha$ -metil-NA nem csökkentette a vérnyomást ugyanazon agyi területbe injektálva. A hatást tehát feltehetően nem  $\alpha_2$ -AR-k, hanem az imidazolin struktúrát felismerő IR-k közvetítik [30]. Később megfigyelték, hogy az IR-khoz egyaránt kötődnek az imidazolin gyűrűvel, illetve a hasonló kémiai szerkezetekkel rendelkező vegyületek is, mint pl. a guanabenz, guanidinium és az oxazol [31].

Az imidazolin hipotézis felvetése után számos kutatás indult el az IR-k lokalizációjának tisztázására, illetve az általuk képviselt jelátviteli útvonalak megismerésére. Viszont a mai napig nehezíti a kutatásokat, hogy az imidazolin ligandok

jelentős affinitással kötődnek  $\alpha_2$ -AR-khoz is [2], illetve legalább ugyanannyi kutatás támasztja alá, mint amennyi vonja kétségbe az IR-k funkcionális szerepét.

#### **1.4. Az imidazolin receptorok (IR) által képviselt jelátviteli útvonalak, szervezeten belüli eloszlásuk**

##### **1.4.1. Az IIR**

Az IIR feltételezett jelátviteli útvonalát eredetileg pheochromocytoma PC12 sejtvonalon írták le, mivel ezen sejtek, a mellékvesevelő chromaffin sejtjeihez hasonlóan nagy számban expresszálnak IIR-kat [32], viszont nem tartalmazzak  $\alpha_2$ -AR-kat, így ez megkönnyíti a szignáltranszdukció vizsgálatát. Az IIR egy pertussis toxin szenzitív G-protein kapcsolt receptor, melyhez az agonista kötődése esetén aktiválódik a foszfatidilkolin-szenzitív foszfolipáz C, amely a foszfatidilkolint foszfokolinná (mely az extracelluláris térbe kerül) és diacilglicerollá hasítja. Az utóbbit a diglicerid lipáz hasítja, majd a monoglicerid lipáz hatására arachidonsav keletkezik belőle. Ebből prosztaglandin E2 (PGE2) vagy egyéb eicosanoidok is létrejöhetnek. Viszont az itt leírt mechanizmus előtt még a digliceridek aktiválhatják a protein kináz C (PKC)  $\beta$ -t. Ellentmondásos bizonyítékok állnak rendelkezésre arról, hogy az IIR aktivációja növeli-e az i.c. kalciumion koncentrációt, valószínűsítik, hogy gátolja a Ca-ATP-áz, ezáltal befolyásolva az iontranszportot [33].

A kitartó kutatások ellenére az IIR molekuláris szerkezete a mai napig nem ismert. Tekintettel arra, hogy mivel az IR-kat kódoló géneket a mai napig nem tudták azonosítani, az irodalomban egyes publikációkban nem receptorként, hanem kötőhelyként említik ezeket a fehérjéket. Dolgozatomban egységesen a receptor elnevezést használom, a publikációk többségének megfelelően, habár ez inkább némenklaturai különbségnek tekinthető. Továbbá itt említeném meg, hogy a receptorok jelátviteli útvonala is csak részlegesen tisztázott, sok esetben a kapott hatásból következtethetünk, hogy az adott receptoron valamely vegyület agonista, vagy antagonist, ezért sok esetben összefoglalóan ligandként beszélnek az adott vegyületről.

Kezdetben az imidazolin ligandok receptorait radioligand kötési vizsgálatokkal különítették el az  $\alpha_2$ -AR-któl. Majd specifikus IR antitesteket hoztak létre, mellyel az IR-

kat különböző sejteken, illetve szövetekben is azonosították. Az első IR ellenes antitest, az imidazolin receptor kötő fehérje (IRBP) nyúlból származó poliklonális antiszérum a szarvasmarha mellékvesévelő chromaffin sejtjeiben található 70 kDa-s IR fehérjéje ellen [34]. Az IRBP viszont egyaránt felismeri az I1R-t és az I2R-t is [35]. Későbbiekben további antitesteket is létrehoztak (pl. anti-nischarin; anti-NISCH), mellyel célzottabban vizsgálták a receptorokat, a receptor asszociált fehérjéket, illetve azok szerkezeten belüli eloszlását [36]. A humán IR antiszérum szelektált (IRAS: IR antisera-selected) proteint [37], illetve egér analógját, a nischarint [38] is azonosították a kutatások folyamán. Az antitestek segítségével megfigyelték, hogy egyrészt az I1R heterogén szerkezetű, és a receptor szintje korrelál az IR asszociált proteinnel, a nischarinnal, amelynek különböző molekulatömegét is azonosították (167 kDa, 100/105 kDa, 85 kDa). A molekulatömeg különbözőségére az izoformák jelenléte adhat választ, akárcsak IRAS esetében a splice variánsok (pl.: IRAS-S, IRAS-M, IRAS-L, IRAS-1) jelenléte [36].

Az I1R KIR-i és perifériás eloszlását különféle állatmodellekben (szarvasmarha, nyúl, patkány) és emberben is leírták. Nagy denzitással fordul elő a receptor a medulla oblongatában, az RVLM nucleus reticularisban (az RVLM-ben hasonló a receptoriális eloszlás humán és szarvasmarha agyban). Ezen túl a receptor megtalálható a cortexben, a striatumban, globus pallidumban és a hypothalamusban egyaránt. A periférián többek között azonosították a mellékvese kromaffin sejtjeiben, a vesék proximális tubulusaiban, a trombocitákon, a glomus caroticumban [39].

#### **1.4.2. Az I2R**

Az I2R-t a kutatások során először a mitokondrium külső membránján azonosították, a monoamino-oxidáz (MAO) alloszterikus kötőhelyeként a MAO-A-ban és a MAO-B-ben egyaránt. Később nem MAO-hoz kötött I2R-kat is azonosítottak egyéb enzimek kötőhelyeként. Ilyen egyrészt az agyi kreatinin-kináz (B-CK) [40], valamint néhány réz-tartalmú enzim, mint a szemikarbazid szenzitív amino-oxidáz (SSAO) [41].

Az I2R enzimaktivitást befolyásoló hatása nem teljesen tisztázott. A kísérletek döntő többségében az I2R ligandok gátolták a MAO-A, illetve a MAO-B aktivitását [42], viszont egyes publikációk szerint enyhén fokozzák a MAO aktivitást [43]. További ellentmondás, hogy az imidazolin ligandok már nanomoláros koncentrációban telítik az

imidazolin kötőhelyeket, gátló hatást csupán mikromoláros koncentrációban hoznak létre, azt sugallva, hogy az imidazolin ligandok a gátlást egyéb kötőhelyen hozzák létre [44].

Akárcsak az I1R, az I2R is heterogén szerkezetet mutat, az IR ellenes antitestek (anti-IRBP, anti-nischarin) segítségével három különböző molekulatömegű fehérjét is azonosítottak: ~30; ~45; ~66 kDa. Megfigyelték, hogy szelektív I2R ligandok krónikus adagolása során egeragyban szignifikánsan változik a 30, 45 és 66 kDa molekulatömegű fehérjék expressziója, tovább erősítve a korrelációt az I2R ligandok és az előbb említett fehérjék között [36]. Továbbiakban az I2R két fő típusát az amiloriddal szembeni érzékenység alapján osztották fel (I2A az amiloriddal szemben nagy, míg az I2B kis affinitással rendelkezik).

Az I2R-t szerkezeti eloszlását is leírták a KIR-ben, illetve a periférián egyaránt. A KIR-ben a cortexben, a striatumban, illetve a gliasejtekben azonosították, míg a periférián I2R-t írtak le a hasnyálmirigyben, májban, prosztatában, húgycsőben, placentában, vesében, a colon epitel sejtjeiben, érfalban, endotélsejtekben, a trombocitákban és az adipocitákban [39].

### **1.4.3. Az I3R**

Az elmúlt években végzett kutatások leírják, hogy az imidazolin struktúrával rendelkező vegyületek képesek fokozni az inzulin szekréciót a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiből, viszont ezt a hatást nem az előzőekben leírt I1R-k, illetve I2R-k közvetítik. Megfigyelték, hogy a hasnyálmirigyre ható imidazolin vegyületek kétféleképpen fejthetik ki inzulin szekréciót fokozó hatásukat [45]. Egyrészt zárják a  $\beta$ -sejteken található ATP-függő és feszültségfüggő K csatornákat, ezáltal a sejt depolarizálódik, aminek következtében megnő az i.c. kalciumion koncentráció, ami az inzulin felszabadulásához vezet. A másik csoportot képező imidazolin ligandok esetében az inzulin felszabadulás fokozása független az ATP-függő K csatornáktól, emelkedett vércukorszint esetében direkt fokozzák a  $\beta$ -sejtek inzulin exocitózist. Ezt a PKC és a citoplazmatikus foszfolipáz A2 jelátviteli útvonal aktiválása indítja el [45]. Viszont normál glükóz-szint esetén megfigyelték, hogy az imidazolin ligand NNC77-0020 stimulálja a szomatosztatin elválasztását, az előbb leírt mechanizmusokon keresztül. Továbbá leírták, hogy az

imidazolin ligandok gátolhatják a glukagon szekréciót a pancreas  $\alpha$ -sejtjeiből, amit a protein foszfatáz calcineurin aktiválása okoz [46].

Egy másik ligand, a BL11282 esetében leírták, hogy képes helyreállítani a glükózra adott kóros inzulinválaszt spontán diabeteses állatokon [45]. Ezenfelül leírták, hogy az endogén imidazolin szerkezetű vegyület, a  $\beta$ -carbolinok közé tartozó harman direkt módon emeli az i.c. kalcium koncentrációt, így fokozza az inzulin szekrécióját [47].

Mivel ezt a receptort eddig csupán a pancreasban írták le, ezért doktori munkám során végzett kísérleteim nem vonatkoztak az I3R-k analízisére a gyomor-bél rendszerben, ezért a továbbiakban ezt a receptor típust nem részletezem.

## **1.5. Az IR-k által mediált hatások**

### **1.5.1. Az I1R által közvetített hatások**

Dolgozatomban az imidazolin receptorok GI hatásait részletezem, viszont ennek ismertetése előtt röviden összefoglalom az IR-k által közvetített főbb nem gyomor-bélrendszeri hatásokat.

Az I1R széles körű KIR-i, illetve perifériás eloszlásának megfelelően számos szervezetbeli hatással bír. Az imidazolin hipotézis felvetésének megfelelően, a kutatások kezdetben az I1R-ra és a cardiovascularis rendszerre fókuszáltak. Az imidazolin agonista vegyületek (clonidin, rilmenidin, moxonidin) mérséklék a szimpatikus aktivitást, ezáltal csökkentik a perifériás vascularis rezisztenciát, ennek megfelelően hipotenzív hatást indukálnak [48]. Feltehetőleg a vérnyomáscsökkentés következtében az imidazolin származékok mérséklék a bal kamra hipertrófiát [49], a falfeszülést, illetve kedvezően befolyásolják a kamrai szívizomzat sejtépítő folyamatait [50]. Renovascularis hipertónia, angiotenzin II által indukált hipertónia esetében a clonidin és strukturális származékai szintén hipotenzív hatást fejtettek ki [51-53]. Viszont a nagy dózisú moxonidin növelte a mortalitást szívelégtelen betegpopulációban, valószínűleg éppen a szimpatikus aktivitás gátlása révén [54-56].

Az I1R aktivációja fokozta a natriuresist és diuresist [57], növelte az ozmotikus clearance [58], mely egyrészt direkt renális, másrészt centrális hatás következménye [58];



59]. Emellett a moxonidin gátolta a vízfelvételt a KIR-i medialis septalis területbe történő adminisztrációja után [60].

Továbbá a moxonidin esetében klinikai vizsgálatokkal is kimutatták, hogy javítja az inzulin érzékenységet és csökkenti a magas koleszterinszintet [61]. Az endogén imidazolin ligand agmatin fokozta az inzulin szekréciót a pancreas  $\beta$ -sejtjeiből, az adipocitákon inzulin-szerű hatást fejtett ki [62, 63]. A fent részletezetteknek megfelelően elmondható, hogy az IIR-k számos KIR-i és perifériás hatással bírnak, és számos kórkép terápiájában lehetnek ígéretes célpontok.

### **1.5.2. Az I2R által közvetített hatások**

A főleg enzimfehérjéken található I2R számos élettani, illetve patológiai folyamat mediálásában vesz részt. A neuropszichiátriai kórképek esetében is a receptor szerepe széleskörű kutatások tárgyát képezi. Egyrészt megfigyelték, hogy az I2R denzitása megváltozik depressziós betegekben [64], továbbá az I2R ligand 2-BFI állatkísérletes modellekben antidepresszánsként viselkedett (csökkentette a mozdulatlanság idejét forszírozott úszás tesztnél) [65]. Leírták, hogy az I2R denzitása csökken a humán putamenben Huntington-kór esetén, Parkinson-kórban viszont nem változik [66], ezzel szemben Alzheimer-kórban megnőtt a receptorszám a frontális cortexben [67]. Továbbá post mortem humán vizsgálatokban megfigyelték, hogy erősen csökken a receptor mennyisége heroin függők agyállományában [67].

Az I2R-k részt vesznek a fájdalomérzet szabályozásában, az I2R ligand BU-224 intrathecalis injekciója csökkentette a nociceptív választ a gerincvelő hátsó szarvának neuronjaiban [68], valamint az endogén imidazolin ligand agmatin fokozta a morfin analgetikus hatását [69].

Továbbá megemlíteném az I2R-k akut, orexigén hatását [70], mely hatás valószínűleg nem centrális szabályozás következménye, ugyanis az I2R ligandok injektálása a harmadik, negyedik vagy oldalsó agykamrába nem idézi elő a hiperfágiát [71]. Az I2R-k által közvetített orexigén hatás éppen ellentétes a moxonidin okozta étvágycsökkenéssel elhízott, spontán hipertóniás patkányok esetében, amit feltehetően az IIR közvetít [72].

## **1.6. Az endogén imidazolin ligandok**

Az imidazolin receptorok felismerése után logikus elképzelés volt az endogén imidazolin ligandok utáni kutatások elindítása. Először 1984-ben írták le, hogy a borjúagyból izolált kivonat képes volt patkány agyi preparátumában a clonidint leszorítani mind az  $\alpha_2$ -, mind az I1 és I2 receptorról. Ezért ezt a vegyületet/vegyületeket „clonidine-displacing substance”-nak (CDS) nevezték el [73]. Ezt követően a CDS feltételezett aktív hatóanyagait is azonosították, ezeket a továbbiakban röviden ismertetem. Fontos azonban megemlíteni, hogy ezen vegyületek egyike sem tudja maradéktalanul teljesíteni azokat a kritériumokat, ami alapján az imidazolin receptorok „igazi” endogén ligandjának tekinthetnénk őket. Hatásaik egyes esetekben eltérnek a szintetikus IR ligandok hatásaitól, ráadásul általában számos egyéb receptorhoz is jelentős az affinitásuk.

### **1.6.1. Az agmatin**

Li és mtsai 1994-ben azonosították emlősök agyából a poliamin bioszintézis egyik köztes termékét, az agmatint (1-amino-4-guanidinobutane), mely L-argininből arginin-dekarboxiláz (ADC) hatására jön létre, majd a diamin-oxidáz, illetve az agmatináz metabolizálja [74]. Az agmatin amellett, hogy az IR-ok elsőként azonosított endogén ligandja, az I1 és I2R-hoz való kötődése mellett számos receptor, csatorna működését is befolyásolja. Kötődik az  $\alpha_2$ -AR-hoz, az NMDA receptorhoz, a neuronális nikotinos ACh receptorhoz, az 5-HT<sub>3</sub> receptorhoz, valamint a feszültségfüggő kalcium és ATP-szenzitív kálium csatornákhöz is. Továbbá gátolja a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) működését [75]. Mindezek következtében számos funkcióval rendelkezik, feltehetően fontos neurotranszmitter/neuromodulátor a KIR-ben [76]. Érdekes megfigyelés, hogy a szervezet agmatintartalmának jelentős része nem de novo szintetizálódik, hanem a bélrendszerből szívódik fel. Ez egyrészt származhat az elfogyasztott élelmiszerből, a bélrendszer flórája, illetve egyes patogén baktériumok (pl. *Helicobacter pylori*) termeléséből, a bél epiteliális sejteinek deszkvamációjából és az enterohepatikus körforgásból egyaránt [77].

Az agmatin szervezeti előfordulását Raasch és mtsai írták le patkányban. Legnagyobb szöveti koncentrációja a gyomorban található, ezt követi az aorta és a vékonybél, majd a vastagbél és a lép agmatintartalma. Ezeken kívül alacsony szöveti koncentrációban, de megtalálható a tüdőben, mellékvesében, vesében, szívben, májban, agyban és a vázizomzatban is [78]. Az agmatin a KIR-ben is széles körben megtalálható, kimutatták jelenlétét többek között a cerebrális cortexben, a primer szomatoszenzoros és auditoros cortexben, az előagyban, subcorticalis neuronokban, NTS-ban és a periaqueductalis areaban [79].

Disszertációm későbbi részében az endogén imidazolin ligandok GI hatásai kerülnek előtérbe, viszont előtte ezen vegyületek egyéb szerepéről is említenék pár szót. Az agmatin számos hatásáról olvashatunk az irodalomban, jelen fejezetben csupán pár eredményt emelnék ki. Állatmodellek esetében az agmatin szisztémás adminisztrációja során fokozta a morfin analgetikus hatását [80], a morfin által kiváltott jutalmazási érzetet [81], gátolta a morfin toleranciát [82], illetve csökkentette a morfin megvonási tüneteit [83]. A fenti hatások létrejöttét az agmatin számos receptorális kötődése mediálja, többek között a glutamát, dopamin és adrenerg rendszerrel való kölcsönhatása [84]. A morfin dependencia/tolerancia gátlásában a  $\mu$ -opioid-receptorok csökkent downregulációja és internalizációja áll, melyért az IIR aktivációja felelős [85].

Az agmatin gyulladáscsökkentő hatásában feltételezhetően az indukálható NOS gátlás, a következményes NO szint csökkenése állhat [86]. A vegyület citoprotektív hatása a szabadgyökök megkötéséből, a mitokondriális funkciók védelméből állhat [87]. Ezt a neuroprotektív hatást támasztja alá, hogy *in vitro* védelmet nyújtott az NMDA okozta excitotoxicitással szemben [88].

Az agmatin antidepresszáns és anxiolitikus hatása nagyrészt az IR-k és az 5-HT<sub>1A/1B</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>-, NMDA-receptorok, az  $\alpha_2$ -AR-k és a kálium csatornákkal történő interakció következménye [84]. A vegyület antikonvulzív hatásáért az  $\alpha_2$ -AR-k és az L-arginin-NO útvonalat teszik felelőssé [89, 90]. Emellett felvetették, hogy az agmatin szerepet játszhat a tanulási és memóriefolyamatok mediálásában is [91].

Az agmatin cardiovascularis rendszerre kifejtett hatásának vizsgálata során megfigyelték, hogy spontán hipertónias patkányok esetében az intravénásan (i.v.) adagolt agmatin csökkentette a vérnyomást és a szimpatikus aktivitást, továbbá preszinaptikus IR-kon keresztül gátolta a NA felszabadulást [92]. Li és mtsai 2000-ben leírták, hogy *in*

vitro körülmények között az agmatin gátolta az AV csomó spontán aktivitását nyulakban, a hatást az  $\alpha_2$ -AR-k és/vagy IIR-k-hoz kötötték. [93].

Az agmatin nefrogén hatása közé sorolható, hogy növelte az ozmotikus clearance-t, a nefron glomerulus filtrációs rátáját, dilatálta az artéria renalist. Ezen hatásokat a szintetikus I2 ligand BU-224 felerősítette, mely arra utal, hogy szerepet játszhatnak az I2R-ok a válasz létrejöttében [94].

Az agmatin további hatása, hogy gátolja daganatos sejtvonalakon a tumorsejtek proliferációját. Humán colon neoplasztikus szövet esetében csökkent az ADC és az agmatin szöveti koncentrációja, hasonlóan köpenysejtes lymphoma, illetve számos szolid daganat, valamint leukémiák esetében is [84].

### **1.6.2. A $\beta$ -carbolinok**

A következő endogén imidazolin csoportot különböző  $\beta$ -carbolinok alkotják, melynek három fő tagja a harman (*1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole*), harmalan (*1-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[3,4-b]indole*) és a norharman (*9H-pyrido[3,4-b]indole*) [95]. A  $\beta$ -carbolinok megtalálhatók számos gyógynövényben (harman: *Peganum harmala*), gabonában (búza, árpa, kukorica), alkoholban (whisky, sör, bor) és a dohányban is. Ezek az alkaloidok az indolaminok (pl.: triptamin) és a rövid szénláncú karboxilsavak (pl.: piroszölősav) vagy aldehidek (pl.: acetaldehid) kondenzációjával keletkeznek, enzimatis folyamat során [96]. A  $\beta$ -carbolinok erősen lipofilek, ezért főleg a KIR-ben találhatók, agyi koncentrációjuk 55x magasabb a plazmáénál [97]. A periférián megtalálhatók a májban, trombocitákban, a szívben és a vizeletelvezető rendszerben [98]. Az említett vegyületek széles receptorális kötődési profillal rendelkeznek. Tekintettel arra, hogy a legtöbb vizsgálat a harmannal történt, a továbbiakban ennek a vegyületnek a hatásait részletezem. A harman inverz agonistája a benzodiazepin kötőhelynek [99], továbbá kötődik a  $\mu$ - és  $\delta$ -opioid-receptorhoz, triptamin-, 5-HT- [100] és a muszkarinos ACh receptorhoz [101], aktiválja a NOS-t [102], illetve fokozza a foszfolipáz C aktivitását [103]. A  $\beta$ -carbolinokról bebizonyosodott, hogy a különböző élettani hatásai nagy részéért a MAO gátlása felel. A harman erősebben gátolja a MAO-A enzimet, de gyengén befolyásolja a MAO-B működését is [104]. A  $\beta$ -carbolinok MAO általi interakciójából következik, hogy befolyásolják a NA, dopamin és

az 5-HT által mediált jelátviteli utakat. A harman 5-HT<sub>2A</sub> receptorok aktiválása révén hallucinogén hatással bír [105].

Számos publikáció foglalkozott a  $\beta$ -carbolinok imidazolin ligandként betöltött szerepével. Ezek közül bizonyított, hogy a harman jelentős affinitással kötődik az I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, kisebb mértékben az I<sub>3</sub> receptorhoz [106]. A harman mikroinjekciója az RVLM-be dózisfüggő vérnyomáscsökkentő hatást fejtett ki, melynél valószínűsítik, hogy I<sub>1</sub>R által mediált hatás [107]. A harman csökkenti a testhőmérsékletet, melyet a szelektív I<sub>2</sub>R liganddal, a 2-BFI-vel történő előkezelés gátolt [108]. Továbbá csökkenti a táplálékfelvételt, valamint I<sub>3</sub>R által közvetítve fokozza az inzulinszekréciót [47].

Kiemelendő továbbá a harman anxiolyticus, antidepresszáns és antikonvulzív hatása, utóbbit különböző epilepszia modelleken is vizsgálták [109].

### **1.6.3. Az imidazol-4-ecetsav ribotid (IAARP)**

A továbbiakban még röviden részletezek egy szabadalom által védett endogén IR ligandot, melyet disszertációm során nem vizsgáltam. Prell és mtsai írták le [110] emlős agyban az imidazolecetsav ribotidot (IAA-RP), mely vegyület szintézise a hisztidin transzaminációjával kezdődik, ezáltal imidazolecetsav (IAA) keletkezik, majd az IAA ribozilációjával fejeződik be. Megfigyelték, hogy az IAA-RP a feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>-csatornákat tartalmazó szinaptoszómákból szabadul fel depolarizációtól függően, mely felveti neurotranszmitter/neuromodulátor szerepét. KIR-i előfordulását tekintve kiemelendő a limbikus régió, ahol a legnagyobb koncentrációban fordul elő, emellett a globus pallidusban, az RVLM-ben, a NTS-ban is megtalálható. Celluláris elhelyezkedését tekintve pedig főleg a sejtestben és dendritekben fordul elő [111]. Továbbá leírták, hogy preszinaptikus IR-kon keresztül az IAA-RP hatással van a szinaptikus plaszticitásra, ezáltal a tanulás és memóriefolyamatokra egyaránt [112]. Számos publikáció szerint az IAA-RP szerepet játszhat a vérnyomás szabályozásában, hiszen a vegyület megtalálható a vérnyomás szabályozásában szerepet játszó agyi régiókban, továbbá az RVLM-be injektálva hipertenzív válasz váltódik ki, a hatás kiváltásában pedig felmerül az IR-k szerepe [110, 111].

## **1.7. Az imidazolin ligandok szerepe a GI rendszerben**

Az imidazolin rendszerrel foglalkozó kutatások során felmerült a kérdés, hogy milyen szerepet játszanak az imidazolin ligandok a GI működés befolyásolásában. Radioligand kötési vizsgálattal IR-kat igazoltak tengerimalac [113], nyúl [114], patkány és ember [115] gyomor-bél rendszerében egyaránt. A nischarint, egy nemrégiben leírt intracelluláris fehérjét, mely az  $\alpha 5\beta 1$  integrinhez kötődve a sejtek migrációját szabályozza [38], de emellett feltehetően szoros funkcionális kapcsolatban áll az IIR-okkal is [116, 117], szintén kimutatták a patkány GI rendszerében [118]. Raasch és mtsai írták le, hogy az endogén imidazolin ligand agmatin legnagyobb szöveti koncentrációban a gyomorban található [78]. A fentiek alapján felvetődik, hogy az imidazolin rendszer fontos szerepet játszhat a GI funkciók szabályozásában.

Az elmúlt években több publikáció is foglalkozott az IR-k szerepével a GI motilitás [119], a savszekréció [120] vagy a gasztroprotekción [121, 122] vonatkozásában. Viszont számos esetben ellentmondásos eredményekről olvashatunk. Ennek egyik lehetséges oka, hogy az imidazolin ligandok jelentős affinitással kötődnek  $\alpha_2$ -AR-khoz is, és az ezen receptorok által mediált hatások elfedhetik, módosíthatják az IR-ok hatásait [2].

### **1.7.1. Az imidazolin ligandok szerepe a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában**

A gasztroduodenalis nyálkahártya normál felépítéséhez és működéséhez alapvető fontosságú, hogy egyensúly álljon fenn az agresszív faktorok (pl.: sósav, pepszin, gasztrin, proteázok, *Helicobacter pylori*) és a protektív faktorok (pl.: mucus, bikarbonát, mikrocirkuláció) között [123]. Ha ez az egyensúly megbomlik, a mukózális barrier kisebb-nagyobb károsodásokat szenvedhet, peptikus fekély alakulhat ki a gyomor, illetve a duodenum területén egyaránt. Míg a nyombélfekélyek létrejöttében jelentős tényezőt képvisel a megnövekedett savszekréció, addig gyomorfekély esetében a savelválasztás bizonyos esetekben normális, vagy akár csökkent [124], a nyálkahártya károsodásáért elsősorban egyéb faktorok (*Helicobacter pylori* fertőzés, nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) alkalmazása, protektív faktorok csökkent működése, stb.) felelősek.

Jelenleg a klinikumban a fő terápiás irány a peptikus fekélyek kezelésében a sósavszekréció csökkentése, míg a defenzív tényezők erősítése háttérbe szorult. *H. pylori* fertőzés esetén a baktérium eradikációja mellett a savelválasztás csökkentése szerepel, mellyel jó hatásokkal gyógyítható az így kialakult peptikus fekély. Viszont bizonyos esetekben (pl. stresszfekély), a savelválasztást csökkentő szerek nem hoznak létre megfelelő gyógyulást [1], ezekben az esetekben a gyomorfekély patogenezisének a háttérében inkább a megváltozott mukózális védelem áll, nem pedig a savszekréció megnövekedése [124]. A jelenleg alkalmazott sósavelválasztást csökkentő protonpumpa-gátlók (proton pump inhibitor: PPI) és a H<sub>2</sub>-receptor antagonisták hosszú távú alkalmazása esetén nem elhanyagolható mellékhatásokkal is kell számolni, mint pl.: a PPI-k növelik a vékonybélfekélyek előfordulását NSAID-dal kombinálva [125]. Egyéb mellékhatás a hypergastrinaemia, osteoporosis, veseelégtelenség fokozása, demencia súlyosbítása, továbbá megfigyelték a PPI-k asszociációját *Clostridium difficile* infekcióval is [126, 127].

A gasztroprotekciónak fokozása egy további lehetséges alternatíva a gyomorfekélyek kezelésében. A gyomornyálkahártya integritásának létrejöttében számos tényező játszik szerepet, ezeket perifériás, illetve centrális komponensekre oszthatjuk. A centrális gasztroprotekciónak létrejöttében a hypothalamus szerepe kétségtelen (fő magjai a nucleus paraventricularis (PVN), illetve a laterális és ventromediális hypothalamus), mely bidirekcionális kapcsolatban áll az autonóm központokkal. Egyrészt a nervus vagus dorzális motoros magja (DMNV), másrészt a thoracolumbalis intermediolaterális sejtoszlop preganglionáris neuronjaiból eredő rostok működését befolyásolva szabályozza a bél-agy tengelyt [128]. Viszont a vagus rostok kettős szereppel bírnak, egyrészt ulceratív hatást is képesek kifejteni, pl. tireotropinfelszabadító hormon (TRH) fokozta a fekélyképződést a DMNV-ba adagolva a savszekréció és a pepszin szekréció fokozásával [129], másrészt viszont a vagus elengedhetetlen nyálkahártya integritásának, a mukózális védelem kialakításának létrejöttében. Ezt támasztja alá, hogy vagotomia után számos gasztroprotektív vegyület jótékony hatása tűnt el alkohollal indukált léziók esetében [130, 131]. A fent említett TRH viszont nonszekretorikus dózisban injektálva a DMNV-ba, gasztroprotektívnak bizonyult vagus-dependens hatáson keresztül, ezt támasztotta alá, hogy az atropin, illetve a vagotomia is gátolta a védelmet [132, 133]. Ezt követően számos neuropeptidről bizonyosodott be, hogy gasztroprotektív (vagus

mediálta), mint pl. az opioidok, kortikotropinfelszabadító hormon (CRF), amilin, bombesin,olecisztokinin (CCK), 5-HT, neurotensin, neuropeptid Y, Y peptid, TRH, vazóaktív intesztinális peptid (VIP), P anyag (SP), oxitocin, prolaktin, enkephalinok, galanin és az urocortin [132, 134]. A vagus rostok viszont számtalan projekciós hálózattal bírnak, pl. a nucleus ambiguus, formatio reticularis, amygdala, stb. állnak összeköttetésben, ezáltal számos egyéb régió is szerepet játszik a mukózális védelem befolyásolásában [135, 136].

Perifériás faktorként kiemelendő a gyomornyálkahártya integritás fenntartásában a gyomornyálkahártya mikrocirkulációja, melyben jelentős szerephez jut gázmediátorként a nitrogén-monoxid (NO) [137] és a hidrogén-szulfid (H<sub>2</sub>S) [138], továbbá régóta ismert a prosztaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) és prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) gasztroprotektív szerepe [139]. A nervus vagus aktivációja során a kolinerg rostok stimulálják a NO [140], PG-k [141], illetve az 5-HT [142] felszabadulását. Továbbá a nervus vagus idézi elő a C-rostok aktivációját, felszabadítva ezzel számos neuropeptidet a szenzoros idegvégződésekből. Publikációk sora igazolta a kapszaicin-szenzitív primer afferensek szerepét a gyomornyálkahártya integritásának fenntartásában [143]. Aktivációja eredményeképpen vazóaktív peptidek szabadulnak fel, mint a calcitonin gén-rokon peptid „calcitonin gene-related peptide” (CGRP), a tachykininek, az SP és a VIP [144-146]. Az SP, a tachykininek csoportjába tartozó neurokinin A [147] és a CGRP gasztroprotektív hatásában elengedhetetlen a NO felszabadulás fokozása [148], ezáltal a szöveti mikrocirkuláció növelése. A CGRP továbbá CGRP1 receptorán keresztül gátolja a savszekréciót [149], melyben az ACh és a gasztrin felszabadulás gátlása, a szomatostatin szekréció fokozása [150] is szerepet játszik.

Kutatásunk során az imidazolin ligandok szerepét vizsgáltuk a gasztroprotektióban. A dokumentált publikációk alapján ellentmondásos képet láthatunk az IR-k és a gyomornyálkahártya léziók kialakulása között. Kutatócsoportunk felvetése alapján az IR ligandok centrális gasztroprotektiót közvetítenek, mivel egyrészt a KIR-ben a centrális gyomorvédelem növeléséért felelős fő területekben, a hypothalamusban és a DVC-ben egyaránt leírtak IIR/ I2R-kat [39], ezen túl ismert, hogy a vagus aktiváció hatására fokozódik a mukózális védelem [130, 131, 140-142]. Továbbá az endogén IR ligand agmatint is kimutatták a DVC-ben és a hypothalamusban egyaránt [79], illetve mind az ADC, mind az agmatináz aktivitása a hypothalamusban a legnagyobb [151].



Ezek mellett felmerül, hogy a perifériás IIR aktiváció is hozzájárulhat a centrális gyomorvédelem fokozásához. Ezt támasztja alá, hogy az IIR jelátviteli útvonalának megfelelően (ld IIR, 1.4.1. alfejezet) a receptor aktiválja a foszfatidilkolin-szenzitív foszfolipáz C-t, ezáltal megnövekedve a gyomorvédelemben alapvető szerepet játszó prosztaglandinok koncentrációja. Továbbá a prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) NO-n keresztül vazodilatátor hatású [152], így fokozhatja a mikrocirkulációt, tovább erősítve a defenzív tényezőket. Továbbá a PGE<sub>2</sub> és PGI<sub>2</sub> is fokozza az angioneogenezist, így növelve a nyálkahártyavédelmet [153], habár ez inkább a krónikus védelemben játszhatna szerepet.

Mint a korábbiakban említettem, az imidazolin ligandokkal szemben nem egyértelmű, hogyan befolyásolják a gyomornyálkahártya léziók kialakulását. Az  $\alpha_2$ -AR-hoz nagyobb affinitással kötődő kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR agonista clonidin kettős hatást fejtett ki a gyomorsavszekrécióra *in vivo* [17, 154]. Alacsonyabb koncentrációban (0.05-0.25 mg/kg i.p.) csökkentette a sósav elválasztását a kolinerg idegek preszinaptikus  $\alpha_2$ -AR-án keresztül [17, 154, 155], viszont nagyobb dózisban adagolva a clonidin (1 mg/kg i.p.), az imidazolinok és az agmatin is fokozta a sósav elválasztását *in vivo* és *in vitro* körülmények között [121, 156]. A savelválasztás stimulálása háttérében feltételezhetően az imidazolinok és az agmatin hisztaminfelszabadulást fokozó hatása állt az enterokromaffin sejtekből [157]. Továbbá az agmatin esetében Glavin és mtsai írták le, hogy i.c.v. és i.p. adagolva egyaránt növelte a sósav és a pepszin szekrécióját, csökkentette a gyomor mucus szintjét, ezáltal súlyosbította a stressz-indukálta gyomornyálkahártya-károsodásokat [121]. Utkan és mtsai dokumentálták, hogy az agmatin szisztémásan adagolva dózisfüggően fokozta az alkoholos fekélyek kialakulását, melynél valószínűsítették, hogy az ulceratív hatásban mind az  $\alpha_2$ -AR-k, mind az imidazolin rendszer szerepehez jut [122]. Ennek ellentmond, hogy a moxonidin, mely IIR iránt nagyobb szelektivitást mutató kevert IIR/ $\alpha_2$ -AR agonista, az előzőekkel leírtakkal szemben éppen gasztroprotektív hatású, savszekréciót csökkentő vegyület, mely hatását egyes kutatások szerint  $\alpha_2$ -AR-n keresztül hajtja végbé [120]. Carlisle és mtsai. viszont az itt kialakult nyálkahártyavédelmet az imidazolin rendszerhez kötötték [158].

Az irodalomban található ellentmondásnak megfelelően vizsgáltuk az imidazolin ligandok gasztroprotektióra kifejtett hatását, melyről részletesen az eredmények fejezet első harmadában írok.

### **1.7.2. Az imidazolin ligandok hatása a gyulladásos bélbetegség állatmodelljére**

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel disease: IBD) fő megjelenési formái a Crohn betegség és a colitis ulcerosa. A két betegség patomechanizmusa meglehetősen komplex, kialakulásában egyaránt szerepet játszanak környezeti és genetikai faktorok, a megváltozott bélflóra összetétel. A nyálkahártya szöveti szerkezetének károsodása következtében a lumenális antigének a bélfalba penetrálnak, ezáltal elindul egy kontrollálatlan, krónikus gyulladásos reakció. Az elmúlt évtizedekben az IBD-k előfordulása ugrásszerűen megnőtt, általánosságban elmondható, hogy a betegség a fejlettebb, iparosodott, nyugati országokban gyakoribb [159, 160].

A gyulladásos bélbetegségek két fő típusánál eltérést tapasztalunk a makroszkópos és a mikroszkópos képben, valamint a gyulladásos citokinvázis profiljában is. A klinikai kép meglehetősen összetett és egyénenként különbözik, valamint a két kórkép esetében is más tünetek dominálnak. Általánosságban elmondható, hogy az IBD-ket hasmenés, hasi fájdalom, véres széklet, fogyás jellemzi. Crohn betegségben viszonylag gyakran fordulnak elő strikturák, sipolyjáratok [161]. A szövettani képnél colitis ulcerosa esetében diffúz nyálkahártyagyulladást láthatunk, mely a colon caudális irányában általában kifejezettebb. Ugyanakkor a neutrofil granulociták infiltrációja látható a lamina propriában és a vastagbél kriptákban, utóbbiban mikroabscessusokat képeznek, ezen túl a kehelysejtek mucin termelődése is csökken. Ezzel szemben Crohn betegségben a makrofágok aggregációja látható, melyek nem elsajtosodó granulómákat hoznak létre. A kórkép megjelenését tekintve a gyulladás a GI rendszer bármely területén kialakulhat, de általában érintett a terminális ileum, illetve annak környezete. A colitis ulcerosával szemben itt szegmentális, transmurális gyulladást látunk [159].

Az IBD-k pathomechanizmusában a nyálkahártya proinflammatorikus, illetve anti-inflammatorikus citokinjei közötti egyensúly felborulása játsza a fő szerepet. A nyálkahártya gyulladásának létrejöttében a dendritikus sejtek, a természetes ölő (NK) sejtek, az intesztinális epiteliális sejtek, a veseszületett limfoid sejtek, a neutrofil granulociták, makrofágok, regulatorikus T sejtek és a mukozális effektor T sejtek által termelt citokinek egyaránt szerephez jutnak [162]. A T helper (Th) sejtek dominanciájában különbséget találunk colitis ulcerosa, illetve Crohn betegség esetében.

Colitis ulcerosában a Th 2 szerepe hangsúlyosabb az ennek megfelelő citokin profillal, mint az interleukin (IL) -5, IL-6, IL-13, tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), transzformáló növekedési faktor (TGF)  $\beta$  [163]. Crohn betegségben nagyobb szerephez jut a Th 1 aktiváció, következményes IL-2, IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) felszabadulással. Továbbá mind a két betegségben jelentős az IL-23/Th 17 tengely, ahol az IL-23 elengedhetetlennek bizonyul a gyulladás indukciójában, aktiválja a dendritikus sejteket és a fagocitákat, továbbá fokozza az IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF és a CXCL1 termelődését [164].

A Crohn betegség, illetve a colitis ulcerosa terápiáját többlépcsős séma építi fel, melyben számos gyógyszer kap szerepet. A terápia alappilérét képezik colitis ulcerosa esetén az 5-aminoszalicilát (5-ASA) és származékai (sulfasalazin, olsalazin, balsalazid). További terápiás lehetőségek a glukokortikoidok, citotoxikus purinanalógok (azathioprin, 6-merkaptopurin), methotrexát, esetleg a calcineurin inhibitorok (cyclosporin, tacrolimus). Az utolsó farmakológiai lépcsőt a biológiai terápiák alkotják (TNF- $\alpha$  ellenes antitestek: infliximab, adalimumab, certolizumab pegol;  $\alpha$ 4-integrin ellenes antitestek: natalizumab és vedolizumab) [165].

Az IBD kezelése az alkalmazott gyógyszerek sokrétűsége ellenére a mai napig nem megoldott, mivel az esetek döntő többségében a terápia élethosszig tart, gyakori az adott gyógyszer esetében a refrakterré válás, illetve nem elhanyagolható a mellékhatások kialakulása. Továbbá a gyógyszerhatás individuális, ezért új terápiás célpontok azonosítására van szükség.

Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy az IIR-ok farmakológiai modulációja gyulladáscsökkentő hatással járhat. Molderings és mtsai például felvetették, hogy az IIR-k nem mások, mint egyes szfingozin-1-foszfát (S1P) receptorok homo- vagy heterodimérjei [166, 167]. Tekintettel arra, hogy az S1P receptoroknak kiemelendő szerepe van az immunsejtek modulálásában, pl.: a szelektív S1P receptor agonista erős gyulladáscsökkentő hatással bírt kémiai úton indukált colitis modellek esetében [168, 169], felvetődik a lehetősége, hogy imidazolin ligandok is rendelkezhetnek immunmoduláló tulajdonsággal. Korábbi kutatások során is megfigyelték, hogy a kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR ligand clonidin a klinikai, az endoszkópos, illetve a szövettani képben is javulást hozott létre colitis ulcerosás betegek esetében [170]. További megfigyelés, hogy a kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR ligand moxonidin csökkentette szérumban a proinflammatorikus

TNF- $\alpha$  szintet posztmenopauzális hypertonias nőkben [171], ezáltal feltehetően gyulladáscsökkentő hatással bír.

Kutatócsoportunk arra a kérdésre kereste a választ, hogy az IIR aktivációja hogyan befolyásolja a colitis ulcerosa egyik állatmodellében (DSS-colitis) a gyulladás mértékét és lefolyását. Fontosnak tartottuk az IIR-ok colitisra gyakorolt hatásának vizsgálatát, hiszen az IIR-k ligandjait vérnyomáscsökkentőként alkalmazzák a klinikumban és egyelőre nem ismert, hogy hogyan befolyásolják IBD-s betegekben a bélgyulladást.

### **1.7.3. Az IR-k és a motilitászavarok**

A bél-idegrendszer zavarai (disorders of gut-brain interaction: DGBI) a GI rendszer krónikus megbetegedései, melyek széles körű klinikai képpel jelentkezhetnek. Két fő megjelenési formája a funkcionális diszpepszia (FD) és az IBS [172]. A FD definíciója a Róma IV kritériumoknak megfelelően a normális gasztroendoszkópos kép mellett visszatérő posztprandiális teltségérzet, az étkezések adagjának minimalizálása a korai jóllakottság miatt, epigasztriális fájdalom vagy égő érzet [173]. FD-ban általánosságban elmondható, hogy a gyomor hiperszenzitivitásával együtt motilitászavar, a fundus akkomodációs zavara jelentkezik.

A betegség vizsgálata során leírták, hogy posztprandiálisan a gyomor antrumának hipomotilitása [174], a migrációs motoros komplex csökkent működése [175], a károsodott duodenalis motoros válasz [176], illetve étkezések után a gyomor fundusának fokozott kontrakciói jelentkeznek [177]. A FD egyes ritka eseteiben leírtak rapid gyomorülülést, de ennek a mechanizmusa nem tisztázott [178].

A terápiás lehetőségek a mai napig korlátozottak. H. pylori pozitív esetekben a baktérium eradikációja eredményt hozhat, ezekben az esetekben H. pylori asszociált diszpepszia áll fenn [179]. Akiknél a tünetek továbbra is fennállnak, tényleges FD-ról beszélhetünk. Kezelési lehetőségként felmerült a savszekréció csökkentése [180], viszont a H<sub>2</sub> antagonisták hatékonyabbnak bizonyultak a PPI-knál. A prokinetikus szerek alkalmazása (a cisapriddal az élen) előnyösebbnek bizonyultak a placebo-kontrollhoz képest, mely 5-HT<sub>4</sub> agonistaként relaxálta a fundust, 5-HT<sub>3</sub> antagonistaként csökkentette a hányingert. Viszont gátolta a HERG K<sup>+</sup>-csatornákat, ezáltal QT megnyúlást okozott, így növelte a hirtelen halál kialakulásának kockázatát [181], ezért kikerült a klinikai

alkalmazásból. A dopamin D2 receptor antagonistá metoclopramid hatékonyságát erőteljesen megkérdőjelezzik, a domperidon pedig szintén QT megnyúlást okozott, ezért szintén nem volt alkalmazható [182]. Az itopriddal kapcsolatban a hatékonyság bizonytalan [183]. Egyes triciklusos antidepresszánsok (pl. amitriptilin) alkalmazása jótékony volt az epigasztriális fájdalom kezelésében, viszont nem befolyásolták a gyomorürülést [184].

További terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyomor fundusának relaxációját előidéző szerek, melyek a gyomor étkezést követő akkomodációját javítják, így csökkentve a postprandiális teltségérzetet [174]. A fundus relaxációját, ezáltal a gyomor akkomodációjának javítását két farmakológiai úton lehet megközelíteni. Egyrészt a NO tartalmú nitrterg rostok aktivációja, esetleg NO donor vegyületek alkalmazása jótékony hatású lehet, viszont ez az út mellékhatásként fejfájást és a hipotóniát okozhat, illetve a hatástartam is rövid ideig tart [174, 185]. Másik lehetőség a motilitászavar kezelésére az excitatorikus motoros neuronok gátlása, mely neuronok főleg kolinerg és a gátlás preszinaptikus gátló receptorok aktivációjával is elérhető [174].

Kutatásunk során célunk volt az imidazolin ligandok hatásának vizsgálata a fundus kolinerg kontrakcióira, illetve a hatást közvetítő receptor azonosítása. Korábbi publikált adat, hogy a clonidin alkalmazása javította a gyomor akkomodációját [186]. Tekintettel arra, hogy a clonidin kevert  $\alpha_2$ -AR/IR ligand, ezért felmerül, hogy a hatás közvetítésében szerepet játszhatnak az IR-k is. Továbbá leírták, hogy léteznek preszinaptikus IR-k is, melyek képesek gátolni a neurotranszmitterek felszabadulását. Erre példa Molderings és társainak publikációja, ahol preszinaptikus IR-k gátolták a NA felszabadulást humán pitvarral végzett kutatások esetében [187]. Később szintén ez a kutatócsoport hasonló eredményt publikált, ahol azt a következtetést vonták le, hogy a preszinaptikus IR-k hasonlítanak egyéb bioamin receptorokhoz és ezek sztereoszelektív módon aktiválhatók [188].

Kutatócsoportunk felvetése, hogy az IR ligandok preszinaptikus IR-kon keresztül gátolhatják a transzmitterek felszabadulását, ezáltal a fundus kolinerg kontrakcióit, így javíthatják a gyomor akkomodációját. Viszont itt is ellentmondásokba ütközünk, mivel CDS esetében írták le, hogy koncentrációfüggően fokozta patkány gyomormotilitását. Habár itt felmerült az imidazolin rendszer szerepe (különböző szelektív antagonisták /angiotenzin II, bradikinin, muszkarin, 5-HT,  $\alpha_2$ -AR, vazopresszin/ nem függesztették fel

a CDS hatását), az ellentmondások feloldása céljából további kísérletekre van szükség annak eldöntésére, milyen szerepe van az IR-knak a fundus kontrakcióinak szabályozásában [189].

Az imidazolin ligandoknak a fundus kolinerg kontrakcióira kifejtett hatásait az eredmények fejezet harmadik részében részletezem.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK:**

Doktori munkám során az imidazolin receptorok gyomor-bél rendszerben betöltött szerepét vizsgáltam. Kísérleteim három fő témakörbe sorolhatók, melyeken belül az alábbi vizsgálati célokat határoztam meg:

### **2.1. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában**

- Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a centrális gasztroprotekción az endogén IR ligand agmatin alkalmazásával
- Az I1R-k és az I2R-k gasztroprotektív hatásának bizonyítása szelektív IR ligandokkal
- A perifériás faktorok azonosítása az agmatin által indukált gyomorvédelemben

### **2.2. Az I1R-k és $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata colitisben**

- Különböző kevert  $\alpha_2$ -AR/IR, szelektív I1R, illetve endogén IR ligandok hatásának vizsgálata a DSS-indukálta colitis modellben
- Az  $\alpha_2$ -AR-ok szerepének tisztázása a colitis pathomechanizmusában

### **2.3. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában**

- Kevert szintetikus és endogén IR ligandok, illetve szelektív I1R és I2R ligandok hatásának vizsgálata az elektromos téringertéssel indukált gyomorkontrakciókra
- Kevert IR ligandok esetében a hatás kiváltásáért felelős receptor azonosítása  $\alpha_2$ -AR KO egerekkel, illetve szubtípus szelektív antagonistákkal

### **3. MÓDSZEREK**

#### **3.1. Kísérleti állatok**

Az alkoholos fekély kísérletekhez hím Wistar patkányokat (140-170 g) alkalmaztam. A 2.5 %-s DSS-indukált colitis modell esetében 8 hetes nőstény C57Bl/6 egereket, míg a 2%-s DSS-indukált colitis modell esetében hím és nőstény WT és  $\alpha_2$ -AR szubtípus KO C57Bl/6 egereket használtam. Az elektromos téringerléssel indukált gyomorkontrakciók regisztrálása in vitro, 20-30 g-os mindkét nemből származó C57Bl/6 egerek fundusán történt. Az  $\alpha_2$ -AR szubtípus KO C57Bl/6-s egerek L. Hein laboratóriumából származtak (Freiburg, Németország). A genotípus azonosítása szubtípus specifikus polimeráz láncreakcióval történt (PCR).

Az állatok tartása légkondicionált ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 12 órás váltott megvilágítású (világítás: 06:00-18:00 óráig) állatsobákban történt. A kísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága által felállított etikai irányelvek által szabályozottan történtek, melyek a Helsinki Deklaráción alapulnak (EC Directive 86/609/EEC). Az állatok leölése humánusan, a szakmai irányelveknek megfelelően történt. A kísérleteket jóváhagyta a Nemzeti Kormányhivatal Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (engedélyek száma: [PEI/001/1493-4/2015]; 22.1/606/001/2010]).

#### **3.2. Alkalmazott vegyületek**

##### **3.2.1. Szelektív $\alpha_2$ -AR ligandok**

A kísérletek során egyrészt szelektív  $\alpha_2$ -AR ligandokat alkalmaztam. A yohimbin (Sigma-Aldrich) nem rendelkezik  $\alpha_2$ -AR szubtípus szelektivitással, míg a BRL 4408 (Tocris Bioscience) szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistaként, az ARC 239 (Tocris Bioscience) szelektív  $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistaként szerepel az irodalomban.



### **3.2.2. Az imidazolin rendszerre ható vegyületek**

A kísérletekhez különböző szintetikus és endogén IR ligandokat alkalmaztam. Ezek közül több nem szelektív, kevert ligandnak tekinthető, azaz  $\alpha_2$ -AR-on és IR-n egyaránt hat.

Az alkalmazott vegyületek közül az AGN 192403 szelektív IIR ligand (Tocris Bioscience), a 2-BFI, BU-224 szelektív I2R ligand (Tocris Bioscience). A clonidin (Sigma-Aldrich), a moxonidin és a rilmenidin (Tocris Bioscience) kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR agonista, a vegyületek szelektivitását különböző állatmodelleken is vizsgálták. Általánosságban elmondható, hogy a clonidin az  $\alpha_2$ -AR iránt nagyobb szelektivitással rendelkezik, míg a moxonidin és a rilmenidin az IIR-hoz köt erősebben [2, 190]. Az agmatin kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR/I2R ligand, a harman (Sigma-Aldrich/Tocris Bioscience) szintén kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR/I2R/I3R-n is ható endogén IR ligand. Az efaroxan kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR antagonist, míg az idazoxan kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonist (Sigma-Aldrich).

### **3.2.3. Vegyületek oldása**

A kísérletek során alkalmazott vegyületek döntő többségét fiziológiás sóoldatban oldottam fel. Ez alól kivételt képez az endogén IR ligand harman, amely vízben oldhatatlan vegyület, ezért a DSS-colitis modell esetében 1.7%-os ecetsav oldatban, míg a gyomorkontrakciók regisztrálásához etanolban oldottam fel a vegyületet. Utóbbi esetben a törzsoldat elkészítése után a hígítási sorhoz már Krebs-oldatot alkalmaztam. A kísérletek során alkalmazott kontroll csoportok az adott vegyület oldószerét kapták.

## **3.3. Vegyületek adagolási módjai**

### **3.3.1. Intracerebroventrikuláris adagolás**

A vizsgált vegyületek intracerebroventrikuláris (i.c.v.) adagolását éber patkányokon végeztem [191]. A hirtelen agnyomásfokozódás megelőzése miatt lassan, egy perc alatt 10  $\mu$ l térfogatú oldatot adagoltam az oldalkamrákba egy mikroinjektorhoz csatlakoztatott 27 G-s tű segítségével.

### **3.3.2. Intraperitoneális és orális adagolás**

A vegyületek adagolását éber állatokon végeztem. Patkány esetében (alkoholos fekély-modell) 0.5 ml/100 g intraperitoneálisan (i.p.), míg egérrel végzett kísérletben 0.1 ml/10g volumenben injektáltam az alkalmazott vegyületeket i.p. és orálisan (DSS-modell) egyaránt.

### **3.4. In vivo kísérletek**

#### **3.4.1. Alkoholos fekély-modell**

A peptikus fekélyek modellezésére számos fekély-modellt hoztak létre a kutatások során, melyek a peptikus fekélyek eltérő aspektusainak vizsgálatára alkalmasak. A savelválasztás tekintetében a fekély-modellek két fajtája a sav-függő és a sav-független fekély-modell. A sav-függő modellek esetében a tesztelt vegyületek védőhatása a savelválasztás csökkentésének eredménye (pl. ciszteamin által indukált fekély-modell [192]). A savfüggetlen fekély-modellek esetében (pl. alkoholos/savas alkoholos fekély-modellek) a nyálkahártya-károsodást nekrotizáló szerek alkalmazásával váltják ki. Ennél a modellenél a savszekréciótól független a mukózális léziók kialakulása, ezért a módszer kiválóan alkalmas a nyálkahártya védő mechanizmusainak tanulmányozására.

Az általunk alkalmazott fekély-modellben a koncentrált alkohol/savas alkohol hatására a gyomorfekély kialakulásának korai szakasza vizsgálható. A károsító ágens hatására a gyomornyálkahártya barrier megsérül, komplex mikrovaskuláris károsodás alakul ki, megnövekedett permeabilitással, csökkent vérátáramlással, melynek következményeképpen 1-2 perc múlva a felszíni kapillárisokban teljes keringési szünet jön létre. Ennek hatására az epitéliumban hypoxia és mély hemorrhagias necrosisok alakulnak ki. Ez a kísérleti módszer a gasztroprotekciónak, a gyomornyálkahártya épségét és integritását fenntartó faktorok működésének tanulmányozására alkalmas [193].

#### 3.4.1.1. Gyomornyálkahártya léziók indukálása

A kísérletek kezdete előtt az állatok 24 órát éheztek, folyadékot viszont szabadon fogyaszthattak. A koprofágia elkerülése céljából az állatokat drótháló alapú ketrecekben tartottuk. A gyomornyálkahártya léziókat állatonként 0.5 ml savas alkohol (98 ml abszolút etanol + 2 ml koncentrált sósav) intragasztrikus adásával váltottam ki. 60 perccel a savas alkohol adása után az állatok CO<sub>2</sub>-dal túlaltattam, gyomrukat eltávolítottam. Ezt követően a gyomrokat a nagygörbület mentén felvágtam, a szervek tartalmát fiziológias sóoldattal átmostam, majd a léziókat kiértékeltem.

A kísérlet során alkalmazott vegyületeket i.c.v. 10 perccel, i.p. 20 perccel a savas alkohol beadása előtt injektáltam. Az antagonistákat az agonistákkal egy időben adagoltam.

#### 3.4.1.2. Bilaterális cervikális vagotómia

A patkányok pentobarbitállal történő elaltatása után (35 mg/kg i.p.) (Serva Electrophoresis GmbH) az állatok mindkét oldali vagusanak cervikális szakaszát kipreparáltam és átvágtam. Az ál-operált állatok vagusát izoláltam, viszont nem metszettem át. A műtéti vágás bezárása után három órával később került sor a további kísérletekre.

#### 3.4.1.3. A kísérlet ütemterve

Az I1R-k és az I2R-k gasztroprotektív hatásának vizsgálatához először az irodalomban leggyakrabban használt endogén IR liganddal kezdtem el a kísérleteimet, melyhez összesen 80 patkányt használtam fel 16 csoportba osztva, alkoholos kontroll csoportot és az agmatin különböző dózisú csoportjait képezve (n=5/csoport). Az agmatint i.c.v. és i.p. adagoltam a következő dózisokban i.c.v.: 0.044; 0.22; 0.88; 1.76; 4.4; 44 és 220 nmol/patkány, illetve i.p.: 0.001; 0.005; 0.02; 0.1; 1; 10 és 50 mg/kg.

Az agmatin hatásának receptoriális analiziséhez egyrészt a kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R antagonistá efaroxant (4 nmol/patkány i.c.v.), a kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxant

(160 nmol/patkány i.c.v.), a szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonistá yohimbint (0.52 nmol/patkány i.c.v.), illetve a szelektív I1R ligand AGN 192403-t (0.52 nmol/patkány) alkalmaztam.

A továbbiakban az I1R-k, illetve I2R-k centrális gasztroprotekciónban betöltött szerepének vizsgálatára egyrészt a szelektív I1R ligand AGN 192403-mal folytattam kísérleteimet, tekintettel arra, hogy a vegyületnél a mai napig nem tisztázott az agonista/antagonista szerep. Másrészt vizsgáltam a szelektív I2R ligand 2-BFI hatását a gyomorvédelem centrális szabályozására. Kísérleteimben a vizsgált csoportokat egyrészt az alkoholos kontroll csoport (savas alkohol per os + vehikulum i.c.v.) másrészt a tesztelt ligandok csoportjai alkották az alkalmazott dózisokban (AGN 192403 esetében: 0.52; 5.27; 52.7 nmol/patkány, 2-BFI esetében: 0.045; 0.45; 4.5 nmol/patkány). Minden csoportban n=5 elemszámmal dolgoztunk.

I.c.v. adagolásnál a vegyületeket 10  $\mu$ l volumenben adtam 10 perccel a savas alkohol adása előtt (antagonistákkal kombinált kísérletben az összterfogat ugyancsak 10  $\mu$ l volt), míg i.p. adásnál az agmatint 0.5 ml/100 g térfogatban 20 perccel a károsító ágens előtt.

A kísérlet végén gyomornyálkahártya mintákat tettem el a mukózális CGRP és szomatosztatin szintek meghatározására. A mérés részletes leírását lásd a 5.6.1. bekezdésben.

#### 3.4.1.4. Az eredmények kiértékelése

A savas alkohol önmagában súlyos nyálkahártya károsodásokat okozott, melyeket makroszkóposan értékeltem. A mukózális léziókat hosszúságuk alapján egy 0-tól 4-ig terjedő pontrendszer segítségével osztályoztam, melyben a pontszerű eróziók, apró hemorrhagiák 1-es, míg a 2, 3, 4 mm-es fekélyek a hosszúságuknak megfelelő pontszámot kapták. A 4 mm-nél hosszabb léziók esetén a teljes hosszúság több rövidebb szakaszra lett felosztva (pl. egy 6 mm-es lézió 4 + 2 pontot kapott). Valamint a fekély vastagságát is figyelembe véve, a vastagabb léziók 2x-es szorzót kaptak. Ezek alapján a különböző fekélyek pontértékeinek összege adta meg az adott gyomor lézió indexét. Az agonisták gasztroprotektív hatását a százalékos gátlás értékével fejeztem ki. Ez a vegyület gátló hatását jelenti az alkoholos fekélyek ellen az alkoholt kapott kontroll csoporthoz

viszonyítva. Kiszámítására a következő képletet alkalmaztam:  $100 - [\text{kezelt csoport fekély indexe} / \text{kontroll csoport fekély indexe}] \times 100$ .

### **3.4.2. Dextrán-szulfát-nátrium (DSS) - indukálta colitis modell**

Az IBD állatmodelljeinek két fő csoportját alkotják a spontán colitis, illetve az indukált colitis modellek. Spontán colitis esetén a gyulladás külső behatás nélkül alakul ki, viszont hátránya a speciális állatfajok miatti korlátozott hozzáférhetőség. Az indukált colitis modellek csoportjába tartozik az adaptív transzfer modell, a kémiai úton, illetve a genetikai manipulációval indukált colitis modellek. Ezek közül az egyik legtöbbször alkalmazott a kémiai úton indukált colitis modellek. Ide tartozik pl. a dextrán-szulfát-nátrium- (DSS: *dextran sulphat sodium*), trinitrobenzénszulfonsav- (TNBS), oxazon-, ecetsav-, NSAID-indukálta colitis modellek. A DSS-colitis modell leginkább a colitis ulcerosa modellezésére alkalmas, mivel ahhoz hasonló szövettani és citokinprofilú képet ad [194].

A DSS-indukálta colitis modell esetében a bélnyálkahártyát károsító vegyület egy szulfatált poliszacharid polimer, a dextrán-szulfát-nátrium  $[(C_6H_7Na_3O_{14}S_3)_n]$ , mely az epithelialis sejtek direkt hiperozmotikus károsodását idézi elő. Ez vezet a mukózális barrier sérüléséhez, lehetőséget adva a baktériumok penetrációjának, majd a gyulladásos folyamat elindulásának [195]. Ez a károsodás caudális irányban annál kifejezettebb, minél nagyobb a vegyület molekulatömege. A makroszkópos képet hiperémia, ödéma, felszínes ulcerációk tarkítják a colon hosszának rövidülésével, valamint az állat súlycsökkenésével. Mikroszkóposan neutrofil granulocita infiltráció, kripták elvesztése, ill. aberráns kripták megjelenése, az enterociták és kehelysejtek pusztulása látható [194]. Hatására leginkább a Th2 sejtek aktiválódnak (akárcsak colitis ulcerosa-ban) következményes proinflammatorikus citokinek felszabadulásával, mint pl. az IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  [163].

#### **3.4.2.1. A colitis indukálása**

DSS-colitis esetén az állatok a károsító ágenszt az ivóvízben oldva fogyasztják el. Kísérleteimben két különböző DSS-colitis protokollt alkalmaztam. A két protokollban

eltérő volt egyrészt az alkalmazott DSS szubsztancia származási helye, a DSS koncentráció töménysége, a behatás időtartama, illetve a colitis súlyosságát reprezentáló betegségindex skálarendszere is. A szubsztancia váltásnál a két DSS vegyület károsító hatását összehasonlítottam és nem volt különbség a két vegyület colitist indukáló hatásában.

A DSS-oldat töménységét és a behatás idejét a protokollváltás során módosítottam, mivel a kialakult colitis súlyossága függ a behatás időtartamától, illetve az oldat töménységétől [194]. Az egyik kísérletsorozatban 2,5%-os DSS-oldatot ittak az egerek (molekula tömeg: 35,000-55,000 Da; TdB Consultancy, Uppsala, Svédország) [196] 3, 5 illetve 7 napon keresztül. Ezzel a protokollal egy közép súlyos colitis létrehozása volt a cél, amellyel az IIR-k lehetséges védőhatása igazolhatóvá válik. A második projekt során viszont már egy enyhébb colitist szerettem volna létrehozni (az IIR ligandokkal végzett eredmények értelmében felmerült az  $\alpha_2$ -AR-k súlyosbító szerepe, részletesen ld. 4.2. alfejezet), ezért 2 %-os (36,000–50,000 Da; MP Biomedicals, Illkirch, Franciaország) DSS-oldatot kaptak az egerek 7 napig. A DSS-oldatokat másnaponta cseréltem a bakteriális felülfertőződés elkerülése céljából. Az állatok testtömegét, táp- és vízfogyasztását a kísérletek időtartama alatt minden nap ellenőriztem.

Az állatok colitisének kifejlődését a betegségindex-el (DAI: disease activity index) jellemeztem, mely az állatok általános állapotából, a széklet konzisztenciájából és vértartalmából tevődött össze. Mint említettem a két protokollnál eltérő pontrendszert alkalmaztam, a 2.5%-s DSS-oldat alkalmazása esetén a DAI egy 0-tól 8 pontig terjedő skálán változott, melynél az állatok általános állapota maximum két pontot (0: jó általános állapot, 1: látható gyengeség/szörzet fénytelenése, 2: rossz általános állapot), a széklet konzisztenciája (0: normál széklet, 1: lágy, még formált, 2: nem formált/vízszerű, 3: vizes hasmenés) és vértartalma (0: nincs vér a székletben, 1: minimális vérzés látható, 2: vércsíkok megjelenése, 3: masszív vérzés) maximum 3-3 pontot kaphat. A 2%-os DSS-oldattal indukált colitis modellel végzett kísérletekben már egy egyszerűsített pontrendszert alkalmaztam, itt a DAI egy 0-tól 5 pontig terjedő skálán foglalt helyet. A skála végpontjai a két pontrendszerben megegyeztek, viszont a pontok felosztása különbözött. Az állatok általános állapota maximum egy (0: jó általános állapot, 1: gyenge állat), a széklet konzisztenciája (0: normál széklet, 1: lágy, még formált, 2:

kifejezetten laza széklet) és vértartalma (0: nincs vér a székletben, 1: minimális vérzés, 2: vérzés a perianális régióban) maximum 2-2 pontot kaphat.

A kísérlet kezdetét követő 7-10. napon az állatokat CO<sub>2</sub>-l túlaltattam, majd a colonjukat eltávolítottam. A colon hosszának rövidülését a kontroll csoporthoz viszonyított százalékos értékben fejeztem ki, mely a gyulladás mértékének másik paramétere [196]. Továbbá teljes bélszegmenseket távolítottam el a disztális colonból, illetve szérum mintákat gyűjtöttem további analízis céljára. A minták -80 °C-on voltak tárolva további felhasználásig, amikor meghatároztam a szövetek myeloperoxidáz (MPO) szintjét, és citokin profilját, valamint a szérumok interleukin-6 (IL-6) szintjét.

#### 3.4.2.2. A vizsgált vegyületek adagolása és oldása

A kísérletek során számos szelektív/kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR és endogén imidazolin ligand szerepét vizsgáltam a DSS-indukálta colitis modellben. A vegyületeket orálisan (harman), illetve i.p. adagoltam. A vizsgált vegyületeket fiziológiás sóoldatban oldottam fel, viszont a vízben oldhatatlan harmant 1.7%-os ecetsavban oldottam fel és orálisan adagoltam.

A vizsgált ligandokat naponta 1x (délelőtt 9:00-kor) injektáltam a kísérletek teljes időtartama alatt (vagyis az állatok CO<sub>2</sub>-l történő túlaltatásáig), azonban az egyik kísérletben a vegyületeket naponta 2x (9:00 és 18:00-kor) adagoltam.

#### 3.4.2.3. A DSS-indukálta colitis karakterizálása

A DSS-colitis karakterizálását a 2.5%-s DSS-oldattal végeztem 48 nőstény egér felhasználásával. Az abszolút kontroll csoport (n=12) 10 napon keresztül csapvizet ivott. A DSS-fogyasztó állatokat három csoportba soroltam aszerint, hogy 3 (n=6), 5 (n=12), vagy 7 (n=18) napig itták a bélnyálkahártya károsító vegyületet (a fennmaradó napokban az állatok csapvizet kaptak). Az első három csoport állatait a 10. napon altattam túl. A negyedik csoportot (7 napig fogyasztották a DSS-oldatot), további három alcsoportba osztottam (n=6), ahol az állatok a 7., 9. és 10. napon lettek túlaltatva.

A 2%-s DSS-oldatot fogyasztó egerek esetében a DSS-oldat hatásának nemek közötti összehasonlításához összesen 37 WT egeret használtam fel, ahol a kontroll

csoportban 7 hím és 13 nőstény, a DSS-fogyasztó csoportban 9 hím és 8 nőstény vett részt. A 2%-s DSS-oldatot fogyasztó egerek a gyulladást kiváltó ágenst 7 napig kapták, majd az állatokat a 8. nap reggelén lettek túlaltatva.

#### 3.4.2.4. Az IR és $\alpha_2$ -AR ligandok hatásának vizsgálata a DSS-colitisre

A továbbiakban a különböző IR és  $\alpha_2$ -AR ligandok hatását vizsgáltam a DSS-colitis lefolyására. A kísérletekhez WT és különböző  $\alpha_2$ -AR szubtypus KO egereket használtam. Az imidazolin és az  $\alpha_2$ -AR ligandok vizsgálatához a következő csoportokat hoztam létre WT egerek esetében: 1. abszolút kontroll csoport (csapvíz + vehikulum i.p./per os), 2. ligand kontroll csoport (csapvíz + vizsgált ligand i.p./per os), 3. DSS-kontroll csoport (2.5%-s, vagy 2%-s DSS-oldat + vehikulum i.p./per os), 4-6. tesztelt ligandok csoportja (2.5%-s, vagy 2%-s DSS-oldat + a vizsgált vegyületek különböző dózisban i.p./per os). A kísérletekhez a tesztelt vegyületek következő dózisait alkalmaztam a DSS-oldat adása mellett: moxonidin és rilmenidin esetében: 0.01; 0.1 és 1 mg/kg; AGN 192403 esetében: 0.1; 1 és 10 mg/kg; efaroxan esetében: 0.1 és 1 mg/kg; agmatin és harman esetében: 10; 30 és 100 mg/kg, illetve 2.5 és 10 mg/kg; míg clonidin esetében: 0.3; 1 és 3 mg/kg. A ligand kontroll csoporthoz a tesztelt vegyületek következő dózisait választottam ki: moxonidin, rilmenidin és AGN192403 esetében 0.1 mg/kg, efaroxan esetében 1 mg/kg, agmatin és harman esetében 30 mg/kg és 2.5 mg/kg, míg clonidin esetében 3 mg/kg. Minden csoportban 6-os elemszámmal dolgoztunk.

Az imidazolin ligandok napi kétszeri adásánál 36 egeret használtam fel, minden csoportban 6-os elemszámmal. A kísérletben a következő csoportokat hoztam létre: 1. abszolút kontroll csoport (csapvíz + fiziológiás sóoldat i.p.), 2. DSS-kontroll csoport (2.5%-s DSS + fiziológiás sóoldat i.p.), 3-6. tesztelt ligandok csoportja (2.5%-s DSS + moxonidin, rilmenidin, AGN192403 0.1 mg/kg, illetve efaroxan 1 mg/kg i.p.)

Az  $\alpha_2$ -AR liganddal végzett kísérleteknél a hatás azonosításához 24 db  $\alpha_{2A}$ -AR KO, 20 db  $\alpha_{2B}$ -AR KO és 29 db  $\alpha_{2C}$ -AR KO egeret használtam fel. A vegyületek vizsgálatához a következő csoportokat hoztam létre  $\alpha_{2A}$ -AR és  $\alpha_{2B}$ -AR génkiütött egerek esetében: 1. abszolút kontroll csoport (csapvíz + fiziológiás sóoldat i.p.), 2. DSS-kontroll csoport (2%-s DSS + fiziológiás sóoldat i.p.), 3-4. clonidin kezelt csoportok (2%-s DSS + 1 és 3 mg/kg clonidin i.p.).  $\alpha_{2C}$ -AR KO egerek esetében a további 5. csoportban a



clonidin harmadik tesztelt dózisát vizsgáltam (2%-s DSS + 0.3 mg/kg clonidin i.p.). A csoportokban 5-ös, illetve 6-os elemszámmal dolgoztunk.

A szelektív  $\alpha_2$ A-AR antagonistá BRL 44408 2%-s DSS-oldatra kifejtett hatásának analizésére 30 db WT egeret használtam fel. Az állatok csoportosítása a következőképpen történt (n=6/csoport): 1. abszolút kontroll csoport: csapvíz + fiziológias sóoldat i.p., 2. ligand kontroll csoport: csapvíz + 3 mg/kg BRL4408 i.p., 3. DSS-kontroll csoport: 2% DSS-oldat + fiziológias sóoldat i.p., 4. tesztelt ligand csoport: 2 % DSS-oldat + 3 mg/kg BRL 44408 i.p., 5. clonidinnel kezelt csoport: 2 % DSS-oldat + 3 mg/kg BRL44408 és 3 mg/kg clonidin i.p.

Mind az oldószert, mind a vizsgált vegyületeket 0.1ml/10g volumenben injektáltam az állatoknak. A fent említett vegyületek dózisa irodalmi adatokon alapulnak [109, 197-204]

### **3.4.3. Lokomotoros aktivitás mérése**

Egy kiegészítő kísérletben 12 egér felhasználásával a clonidin szedatív hatását vizsgáltam. Az egereket 7 napig kezeltem és két csoportba osztottam (n=6/csoport): 1. csoport: csapvíz + fiziológias sóoldat i.p.; 2. csoport: csapvíz + clonidin 3 mg/kg i.p. A lokomotoros aktivitás mérése 3 egymást követő napon történt (a DSS kezelés 5., 6. és 7. napján) 3 különböző időpontban (30 perccel, 3 órával és 6 órával a clonidin injekció után). A lokomotoros aktivitás rögzítése a CONDUCTA viselkedés és aktivitásvizsgáló, felvevő és analizáló rendszer segítségével történt. A CONDUCTA rendszer lehetőséget ad a laboratóriumi rágcslók motilitásának monitorozására infravörös érzékelők segítségével (Experimentia, Magyarország). Jelen rendszer esetében három, egymástól elválasztott fekete doboz (40x50x50 cm) segítségével mértem egyszerre három állat aktivitását (futás, sétálás) 20 percig. Az állatok mozgását kamerával rögzítettem, majd a felvett videofilet értékeltem ki [205].

### **3.5. Ex vivo kísérletek**

#### **3.5.1. Elektromos téringerléssel (EFS) indukált gyomormotilitás mérés: a gyomorfundus kipreparálása**

Az állatok CO<sub>2</sub>-l történő túlaltatását követően a gyomor fundus részét eltávolítottam, majd az átöblített, gyomortartalomtól mentes fundust 37 °C-os, karbogénnel (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) dúsított Krebs-oldatot (összetétele (mM): 118.0 NaCl, 25.0 NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.0 glükóz, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>) tartalmazó Petri-csészébe helyeztem. Ezt követően kereszt-vágásokat ejtettem a hosszanti izomzatra párhuzamosan, így jött létre a kb. 2-2,5 cm hosszú preparátum [206]. A kipreparált fundus stripet 5 ml-es karbogénnel dúsított Krebs-oldatot tartalmazó szervfürdőben függesztettem fel két elektróda közé. A preparátum felső vége egy transzducerrel érintkezett, mely egy erősítőn keresztül kapcsolódott a számítógéphez. A 0.5 g-s előfeszítést követően a kontrakciókat elektromos téringerléssel (electric field stimulation: EFS) indukáltam, melyek paraméterei a következők: 1ms pulzus szélesség, 25 ütés, 9 V/cm, 5 Hz szupramaximális feszültség, 60 másodpercenként ismételve. Az EFS-indukált gyomorkontrakciókat az atropin felfüggesztette (1 μM), bizonyítva a kontrakciók kolinerg eredetét.

#### **3.5.2. EFS-sel indukált gyomorkontrakciók regisztrálása**

Az EFS-sel indukált kontrakciókat az Experimetria ISOSYS 8 csatornás in vitro assay rendszer segítségével analizáltam. A stimuláció megkezdését 25-35 perc egyensúlyi idő követte, melynek célja a kontrakciók stabilitásának elérése volt. Ezt követően adagoltam a vizsgált IR ligandokat (clonidin, moxonidin, rilmenidin, agmatin, harman és 2-BFI) a szervfürdőbe kumulatív módon, 5 perces időközönként (későbbiekben az 5 kontrakció átlagát értékeltem ki). Antagonista alkalmazása esetén (AGN 192403; BU-224; idazoxan; BRL 44408 és ARC 239) az agonista dózis-hatás görbéjének felvétele után, mosás nélkül egyszeri 10 μM-os dózisban adtam a szervfürdőhöz a vizsgált antagonistát, melyet 20 perces egyensúlyi idő követett. Jelen

esetben célom volt az agonista által kiváltott hatás felfüggesztése. A vizsgált ligandok oldatának volumene nem haladta meg a szervfürdő térfogatának 1%-t.

### **3.6. In vitro kísérletek**

#### **3.6.1. Gyomornyálkahártya CGRP és szomatosztatin szintjének meghatározása**

Az alkoholos fekély-modellel végzett kísérletek egy részében az állatok CO<sub>2</sub>-I történő túlaltatása után a gyomrokat eltávolítottam, a nyálkahártyát lekapartam majd a mérésig -80 °C-on tároltam. A CGRP és szomatosztatin koncentrációk meghatározása radioimmunoassay (RIA) módszerrel Prof. Dr. Németh József és munkatársai segítségével történt [207, 208]. A CGRP antiszérum az  $\alpha$ -CGRP-marha thyroglobulin antigén ellen lett termeltetve nyúlban (C1012 számú), a szomatosztatin antiszérumot az SST-14-marha thyroglobulin ellen termeltették birkában (757/7 számú). A <sup>125</sup>I izotóppal jelölt Tyr(1)-somatostatin-14 (Sigma), illetve a Tyr- $\alpha$ -CGRP (Bachem) peptidek előállítása iodogénnel történt, majd a monojódzott peptid HPLC oszlopon lett elválasztva a többi származéktól [208]. Kontrollnak szintetikus peptideket alkalmaztunk 0-1000 fmol/ml (szomatosztatin) és 0-100 fmol/ml (CGRP) koncentrációs hígításban. A mérési limit 2 fmol/ml a szomatosztatin és 0.2 fmol/ml a CGRP esetében. A két peptid koncentrációját a szövet tömegéhez viszonyítottuk, értékét fmol/mg-ban fejeztük ki.

#### **3.6.2. Colon disztális szakaszának szövettani analízise**

A DSS-colitises kísérletek egy részében, az állatok túlaltatása után a teljes bélszegmenst tartalmazó disztális colon minták fixálása 40 mg/ml pufferezt formaldehid oldatban történt Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna és munkatársai, illetve Dr. Puskár Zita és munkatársai segítségével. A fixálást a minták paraffinba ágyazása követte, majd 5  $\mu$ m-es vastagságú metszeteket készítettünk, amiket hematoxilin-eozin-festéssel festettünk meg. A metszetek értékeléséhez Olympus BX51 mikroszkópot alkalmaztunk, a digitális fényképeket Olympus DP50 kamerával készítettük. A colon mintákból készített metszetekről kvalitatív (imidazolin ligandokkal végzett kísérletek), illetve kvantitatív (clonidines kísérletek) elemzések készültek. A kvantitatív elemzéshez az alábbi

paraméterek figyelembevételével a következő pontrendszert alkalmaztuk: gyulladás mértéke (0: nincs, 1: enyhe, 2: közepes, 3: súlyos), a gyulladás mélysége (0: nincs, 1: mucosa, 2: mucosa és submucosa, 3: transzmurális), a kriptakárosodás mértéke (0: nincs, 1: bazális 1/3 érintett, 2: bazális 2/3 érintett, 3: csak a felületes epitélium ép, 4: kripták és epitélium elvesztése), a mukóza terület érintettsége (1: 1-25%, 2: 25-50%, 3: 51-75%, 4: 76-100%). A teljes szövettani pontszám (0-14 pontig) az egyes paraméterek pontjainak összegéből adódott össze.

### **3.6.3. Colon szöveti MPO szintjének meghatározása**

A DSS-colitises kísérleteknél az állatok túlaltatása után (egyes csoportokból) a disztális colonból teljes bélszegmenst tartalmazó mintákat tettem el, melyekből meghatároztam az MPO szöveti szintjét, amely a neutrofil granulociták infiltrációjának mértékével korrelál. A mintákat a tömegük lemérése után lízis pufferben homogenizáltam, ami 200 mM NaCl-t, 5 mM EDTA-t, 10 mM tris-t, 10% glicerint, 1 mM PMSF-t (pH 7.4) és proteáz inhibitor koktélt (cOmplete ULTRA Tablets, Roche, Basel, Svájc) tartalmazott. A felülúszó MPO tartalmát egér fehérjére specifikus enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), kit segítségével mértem meg (Hycult Biotechnology, Uden, Hollandia). A homogenizátumok fehérje koncentrációjának meghatározásához bikinolinil dikarbonsav (bicinchoninic acid: BCA) assay kitet használtam (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, USA), melyhez standardként szarvasmarha szérumból albumint alkalmaztam. Az MPO szintjét ng/mg szöveti fehérje értékben fejeztem ki.

### **3.6.4. Szérumból IL-6 szintjének meghatározása**

Az állatokból levett vér megalvadása (30 perc szobahőn állás) után a mintákat lecentrifugáltam (2000<sup>x</sup>g, 4 °C, 10 min), majd a szérumból -80 °C-on tároltam (DSS-colitises kísérletek). A szérumból IL-6 tartalmát egér fehérjére specifikus ELISA kit segítségével határoztam meg (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A minták fehérje tartalmát BCA módszerrel mértem meg, melyhez szarvasmarha szérumból albumint használtam standardnak. Az IL-6 szintjét pg/mg fehérje értékben fejeztem ki.

### **3.6.5. Colon szöveti citokinszintjének mérése**

Az állatok túlaltatása után a disztális colonból (DSS-colitis) teljes bélszegmenst tartalmazó mintákat tettem el az ultramélyhűtőbe, melyekből a colon szöveti citokinszintjeit egér citokin panel segítségével határoztam meg (Mouse Cytokine Array Panel A; R&D Systems Europe, Abingdon, UK) [209]. A mintákat tömegük lemérése után 1 mM PMSF-t és proteáz inhibitor koktélt (Roche, Basel, Svájc) tartalmazó lízis pufferben homogenizáltam (részletesen ld. 3.6.3 fejezet). A mintákhoz Triton X-100-t adtam, úgy, hogy annak végső koncentrációja 1% legyen. Ezt követően a sejtes elemek eltávolítása céljából a mintákat 10000 g-val 5 percig centrifugáltam, majd fehérjetartalmukat BCA módszerrel meghatároztam. Ezt követően 600 µg fehérjét tartalmazó mintákat kevertem össze biotinilált antitestekből álló koktéllal, majd ezt egész éjjel inkubáltam 4 °C-on, 40 különböző anti-citokin antitest tartalmú nitrocellulóz membránon, duplikátum formájában. Következő nap mosás után a membránhoz kötött citokineket kemolumineszcens technikával mutattam ki (Chemidoc XRS<sup>+</sup>; Bio-Rad, Hercules, CA). A minták által az adott pontokban kibocsátott fény intenzitását denzitometriás módszerrel megmértem, (Image Lab Software, Bio-Rad, Hercules, CA), amit a referenciapontok pixel denzitás értékére (10,000) normalizáltam [209].

### **3.7. Statisztika**

A doktori munkám során bemutatott kísérleti eredményekben a kapott értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják. Statisztikailag szignifikáns eltérésnek  $p < 0.05$  értéket tekintettem. A statisztikai analízishez Student's t-tesztet, egyutas ANOVA módszert (Newman-Keuls, illetve Holm-Sidak post hoc teszt), Mann-Whitney, Kruskal-Wallis tesztet (Holm-Sidak post hoc teszt), Friedman tesztet, illetve kétutas ismételt méréses ANOVA módszert alkalmaztam (Newman-Keuls post hoc teszt). A túlélési rátát Kaplan-Meier teszttel elemeztem.

A gyomormotilitási vizsgálatoknál az agonisták 50%-os effektív koncentrációjának ( $EC_{50}$ ), valamint a maximális gátló hatásának ( $E_{max}$ ) meghatározása a kapott mérési értékekre Hill 4 egyenlettel illesztett sigmoid koncentráció-hatás görbékből történt.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában**

#### **4.1.1. Az I1R-k és az I2R-k gasztroprotektív hatásának vizsgálata az endogén IR ligand agmatinnal**

A kísérlet során alkalmazott savas alkohol hatására a gyomor mukózális rétege jelentősen károsodott (reprezentatív fénykép: 1. ábra A). Az agmatin (0.044; 0.22; 0.88; 1.76; 4.4; 44; 220 nmol/patkány) i.c.v. injektálva gátolta az alkoholos fekélyek kialakulását (reprezentatív fénykép: 1. ábra B; 2. ábra), maximális védőhatást 0.88 nmol/patkány dózisban (lézió index az alkoholos kontroll csoporttal összehasonlítva 27%) ért el. Az agmatin dózis-hatás görbéje harang alakú, a nagyobb alkalmazott dózisokban a gyomorvédő hatás csökkent (44 és 220 nmol/patkány; 2. ábra).

Perifériás (i.p.) adagolásnál az agmatin gyengébb gasztroprotektív eredményezett, mint i.c.v. adásnál (2. ábra). Az alkalmazott dózisok közül (0.001; 0.005; 0.02; 0.1; 1; 10 és 50 mg/kg) szignifikáns mukózális védelmet csupán 0.005, 0.002 és 0.1 mg/kg-os dózisban tudott létrehozni (lézió index a kontroll csoporthoz viszonyítva 75, 65 és 72 %).

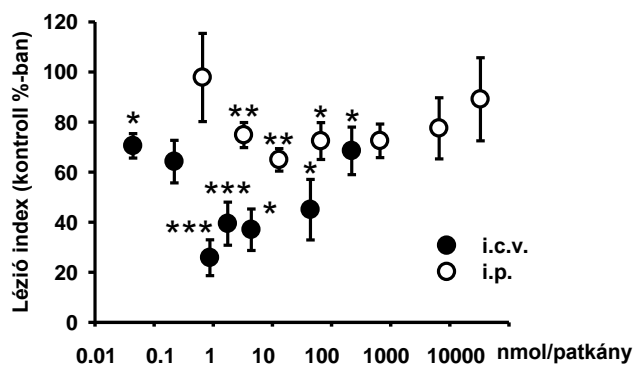
**A**



**B**



1. ábra. Reprezentatív fénykép patkány gyomrokról, mely az agmatin gátló hatását mutatja (0.88 nmol i.c.v., B) az alkoholos fekélyek ellen a kontrollhoz (fiziológiás sóoldat i.c.v., A) viszonyítva.

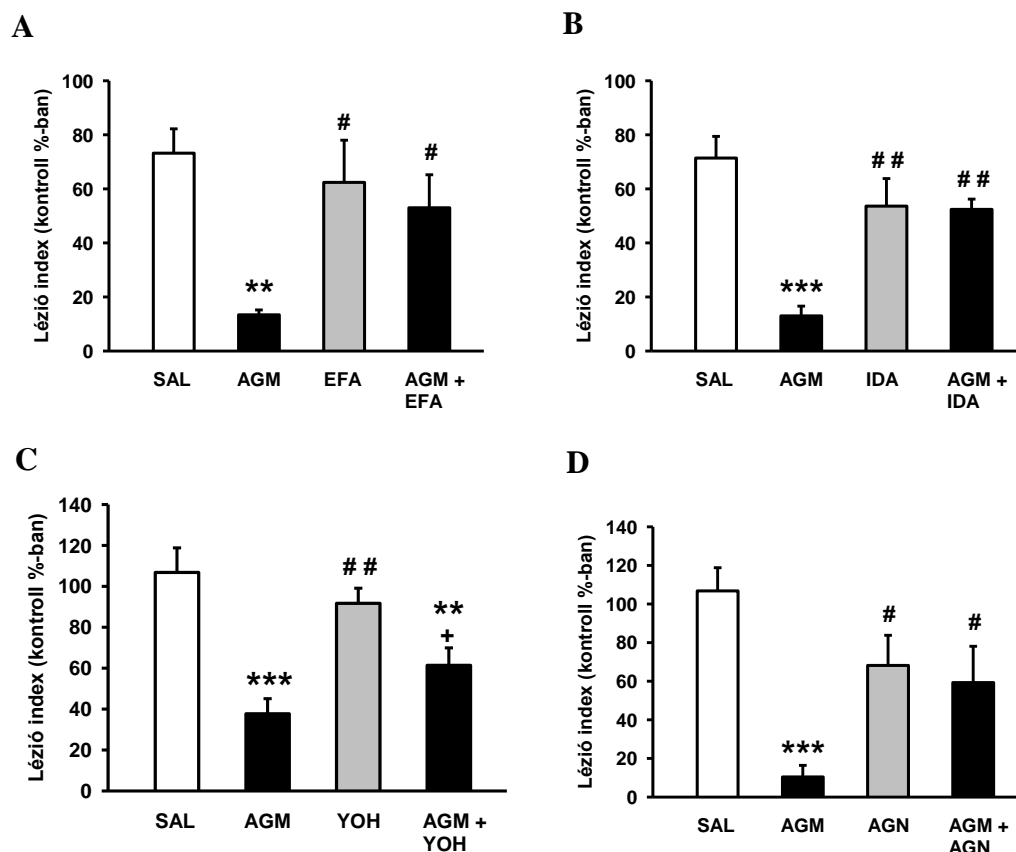


2. ábra. Az agmatin gátló hatása az alkoholos fekélyek kialakulására i.c.v. és i.p. adagolást követően. Az eredmények a kísérletek során kapott értékek átlagát és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  összehasonlítva az alkoholos kontroll (fiziológiás sóoldatot kapott) csoporttal (egyutas ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ /csoport).

#### **4.1.2. Az IR-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata az agmatin által kiváltott centrális gasztroprotekciónban**

Mivel az agmatin i.c.v. erősebb gyomorvédelmet közvetített (2. ábra), felmerült a centrális IR-k (illetve  $\alpha_2$ -AR-k) gasztroprotektív szerepe, ezért a továbbiakban farmakológiai antagonizmussal vizsgáltam a centrális IR-k és az  $\alpha_2$ -AR-k szerepét az agmatin által indukált nyálkahártyavédelemben. Az i.c.v. injektált agmatin védőhatását teljes mértékben felfüggesztette a kevert  $\alpha_2$ /I1R antagonistá efaroxan, valamint az  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxan (4 nmol/patkány és 160 nmol/patkány dózisban), míg az  $\alpha_2$ -AR antagonistá yohimbin (50 nmol/patkány) a védelmet csupán részlegesen függesztette fel (3. ábra A-C). Az antagonisták önmagukban nem befolyásolták az alkohol okozta nyálkahártya-károsodásokat.

Mivel a mai napig nem tisztázott, hogy a szelektív I1R ligand, AGN 192403 agonistaként vagy antagonistaként kötődik a receptorához, ezért vizsgáltam, hogy képes-e befolyásolni az agmatin által létrehozott gyomorvédelmet. Az AGN 192403 (0.52 nmol/patkány) szignifikánsan csökkentette az agmatin által indukált gasztroprotekción (p<0.05; lézió index:  $59.3 \pm 18.8$  szemben az agmatint önmagában kapó csoport  $10.4 \pm 6$  értékével) (3. ábra D).



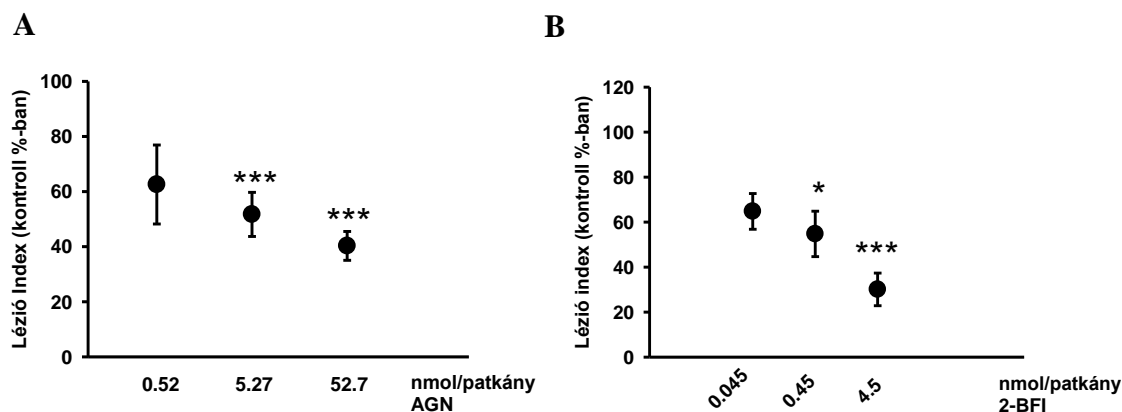
3. ábra. Efaroxan (EFA, 4 nmol/patkány i.c.v., A), idazoxan (IDA, 160 nmol/patkány i.c.v., B), yohimbin (YOH, 50 nmol/patkány i.c.v., C) és AGN 192403 (AGN, 0.52 nmol/patkány i.c.v., D) hatása az agmatin által kifejtett gyomornyálkahártya védelemre. Az oszlopok az adott lézió indexek százalékban kifejezett átlagát tüntetik fel a szórással együtt (S.E.M.),  $n=5$ /csoport elemszámmal. Szignifikanciák: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL) kezelt csoporttal (első oszlop); # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  összehasonlítva az agmatinnal kezelt csoporttal (második oszlop); + $p<0.05$  összehasonlítva az antagonistával kezelt csoporttal (harmadik oszlop) (egyutas ANOVA, Newman–Keuls post hoc teszt).

#### **4.1.3. Az I1R-k és az I2R-k centrális gasztroprotektív hatásának vizsgálata szelektív IR ligandokkal**

A továbbiakban a centrális I1R-k és I2R-k gyomorvédő szerepének bizonyítására szelektív IR ligandokat alkalmaztam. Az I1R ligand AGN 192403 (0.52 - 52.7 nmol) és a szelektív I2R ligand 2-BFI (0.45 – 4.5 nmol) i.c.v. adagolást követően egyaránt gátolta



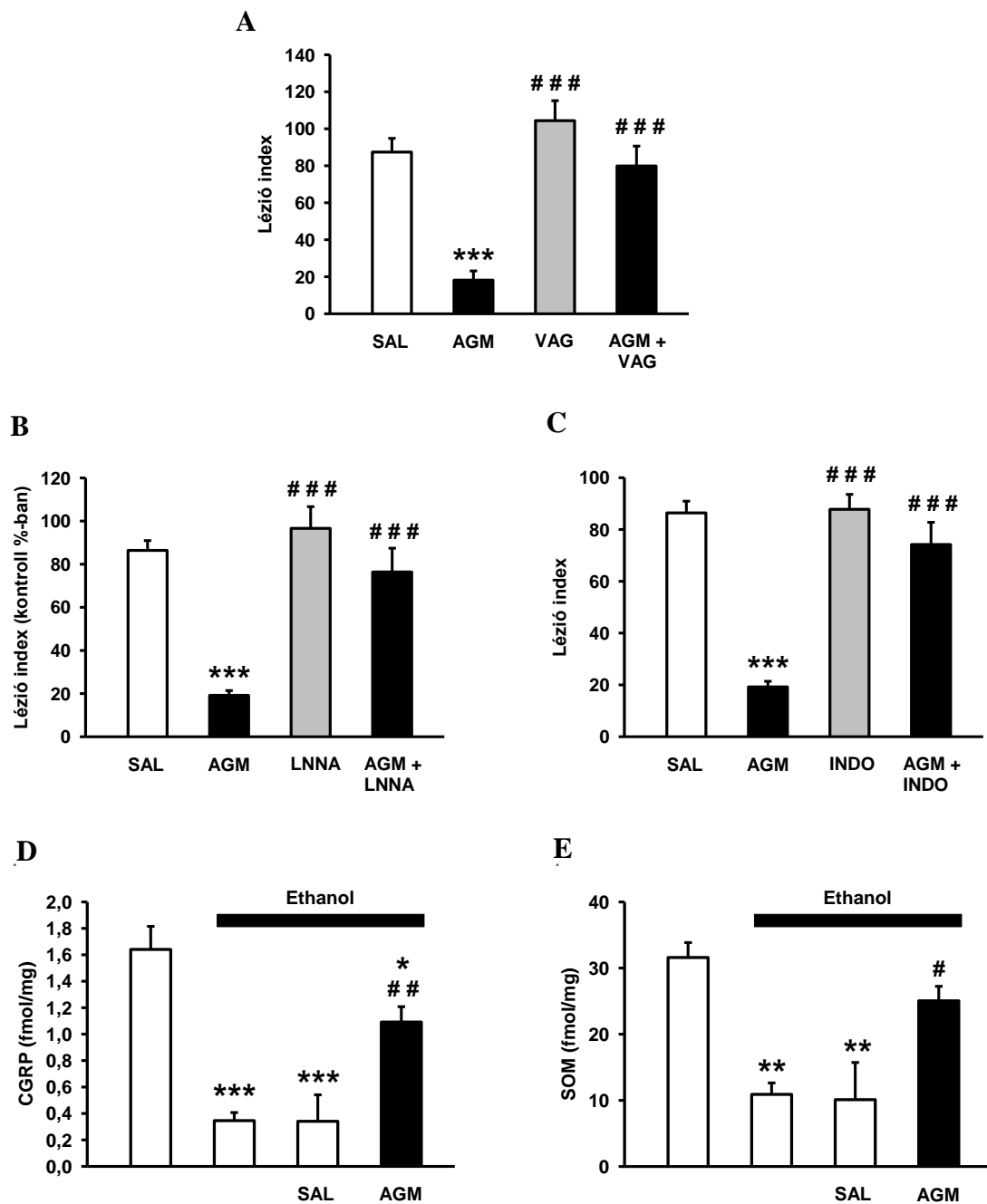
az alkoholos fekélyek kialakulását a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az AGN 192403 az alkalmazott legmagasabb dózisban (52.7 nmol) 60%-kal gátolta a fekélyek kialakulását (a lézió index a kontroll csoportban kapott érték 40%-a; 4. ábra A). 2-BFI esetében a gasztroprotektív hatás szintén a legnagyobb dózisban (4.5 nmol) volt a legerőteljesebb, itt a lézió index a kontroll csoportban kapott lézió index 30 %-a (4. ábra B)



4. ábra. Az AGN192403 (AGN, 0.52-52.7 nmol/patkány i.c.v., A) és a 2-BFI (0.045-4.5 nmol/patkány i.c.v., B) hatása az etanol-indukálta nyálkahártya károsodásra. A körök az adott csoportok átlagolt lézió indexét mutatják a szórásokkal (S.E.M.) együtt (n=5/csoport). \*\*\*p<0.001 összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal kezelt csoporttal (egyutas ANOVA, Newman–Keuls post hoc teszt).

#### **4.1.4. A nervus vagus és a perifériás faktorok szerepe az agmatin indukálta gyomornyálkahártya védelemben**

Az agmatin gasztroprotektív hatását felfüggesztette egyrészt a bilaterális cervikális vagotomia, másrészt a nyálkahártyavédelem megszűnt a N<sup>G</sup>-nitro-l-argininnal (L-NNA) (NO szintézis gátló, 3 mg/kg i.v.), illetve az indometacinnal (PG szintézis gátló, 20 mg/kg per os) történt előkezelés hatására (5. ábra A-C). Sem a vagotomia, sem az előkezelések nem befolyásolták önmagukban az alkohol-indukálta gyomornyálkahártya-károsodásokat. A CGRP és szomatosztatin szöveti szintje a savas alkohol hatására jelentősen csökkent, viszont ezt nem figyelhetjük meg az agmatinnal kezelt csoportban (5. ábra D-E).



5. ábra. Bilaterális cervikális vagotómia (VAG, A), LNNA, (3 mg/kg i.v., B) és indometacin (INDO, 20 mg/kg p. os., C) hatása az agmatin által indukált gasztroprotekcióra (AGM, 0.88 nmol/patkány i.c.v.). Az LNNA és az indometacin az agmatin beadása előtt lett adagolva 15, illetve 60 perccel. Az agmatin injektálását 10 perccel követte a savas alkohol adása. Az oszlopok az adott csoportok átlagát képviselik a szórással együtt ( $\pm$  S.E.M.),  $n=5$ /csoport elemszámmal. \*\*\* $p<0.001$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldatot (SAL) kapott csoporttal (első oszlop); ### $p<0.001$  összehasonlítva

az agmatinnal kezelt csoporttal (második oszlop) (egyutas ANOVA, Newman–Keuls post hoc teszt).

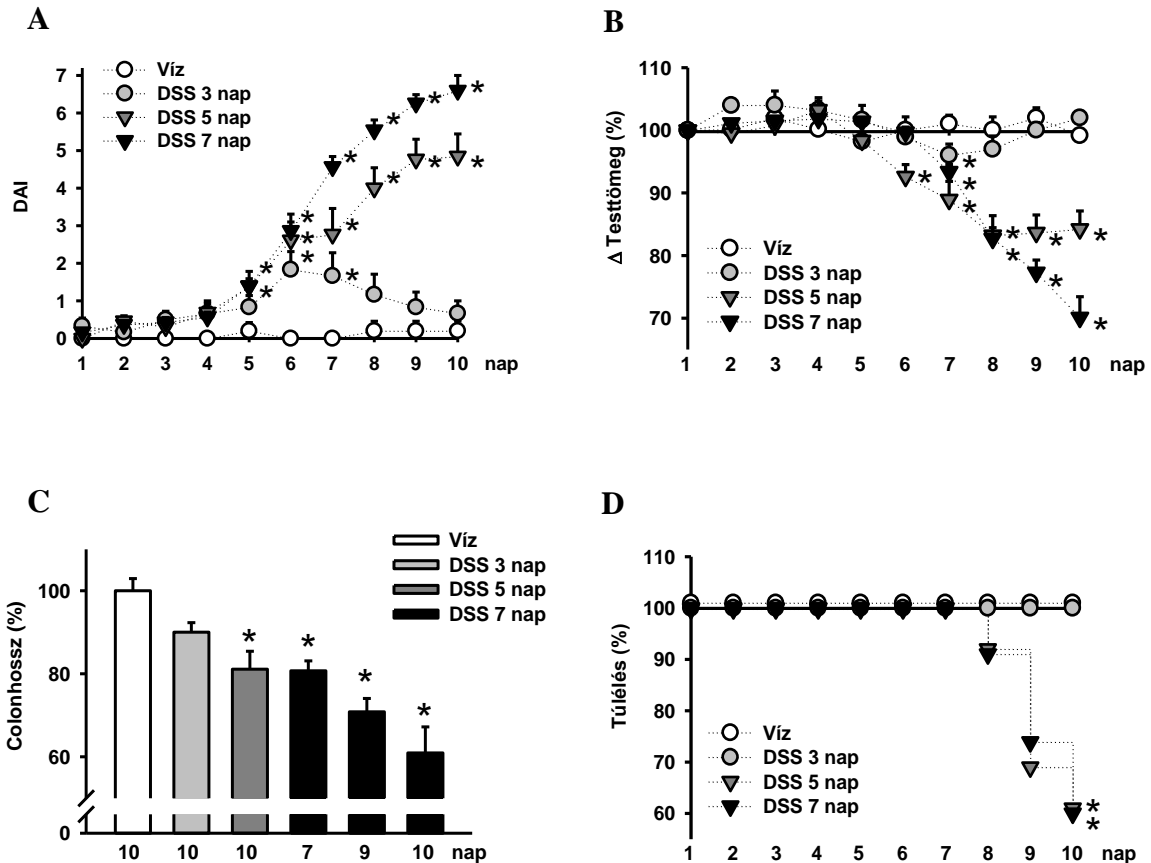
D, E: az agmatin (AGM, 0.88 nmol/patkány i.c.v.) hatása a nyálkahártya CGRP (D) és szomatosztatin (SOM, E) koncentrációjára. Az oszlopok az adott csoportok átlagát képviselik a szórással együtt ( $\pm$  S.E.M.),  $n=5$ /csoport elemszámmal. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  összehasonlítva az abszolút kontroll csoporttal (nincs alkoholos kezelés: első oszlop); # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  összehasonlítva az alkoholt kapott csoporttal (i.c.v. kezelés nélküli, illetve fiziológiás sóoldatot kapott csoport: második és harmadik oszlop) (egyutas ANOVA, Newman–Keuls post hoc teszt).

## **4.2. Az IIR-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata DSS-indukálta colitis modellen**

### **4.2.1. A DSS-indukálta colitis karakterizálása az imidazolin ligandokkal végzett kísérletekhez**

A DSS-indukálta colitis súlyossága számos faktortól, köztük a DSS expozíció időtartamától [210] is függ, ezért először különböző időtartalmú protokollokban (3, 5 és 7 napos itatás) karakterizáltam a 2.5 %-os DSS oldat által kiváltott colitis lefolyását. A DSS-oldat minden csoportban kiváltotta a hasmenéssel, vérszékeléssel, súlycsökkenéssel, colon hosszának rövidülésével járó gyulladásos válaszreakciót, mely tünetek erőssége a DSS expozíció időtartamával szorosan korrelált (6. ábra). Mivel a DSS-oldat 3 napos expozíciója az ezt követő 7 napos gyógyulási periódussal csupán enyhe colitist váltott ki (6. napon volt a tünetek csúcspontja), ezért megnőveltem az expozíció időtartamát. A DSS-oldat 5, illetve 7 napig történő itatása már jelentősebb gyulladásos tüneteket váltott ki. A kutatócsoportunk hipotézise az volt, hogy az IIR ligandok csökkentik a DSS-által kiváltott colitis súlyosságát, ennek megfelelően a célunk a súlyosabb bélgyulladás kiváltása volt, ezért a 7 napos DSS expozíciót választottuk. A további karakterizálás céljából a kísérleteket az állatok egyik csoportjában a 7 napos DSS-expozíció után rögtön leállítottuk, a másik két csoportban az állatok a kísérlet kezdetét követő 9. és a 10. napon lettek túlaltatva. Mivel a gyulladás egyik fő paramétere, a colon rövidülés a 9. és a 10. napon volt a legmasszívabb, viszont a 10. napon a halálozás már

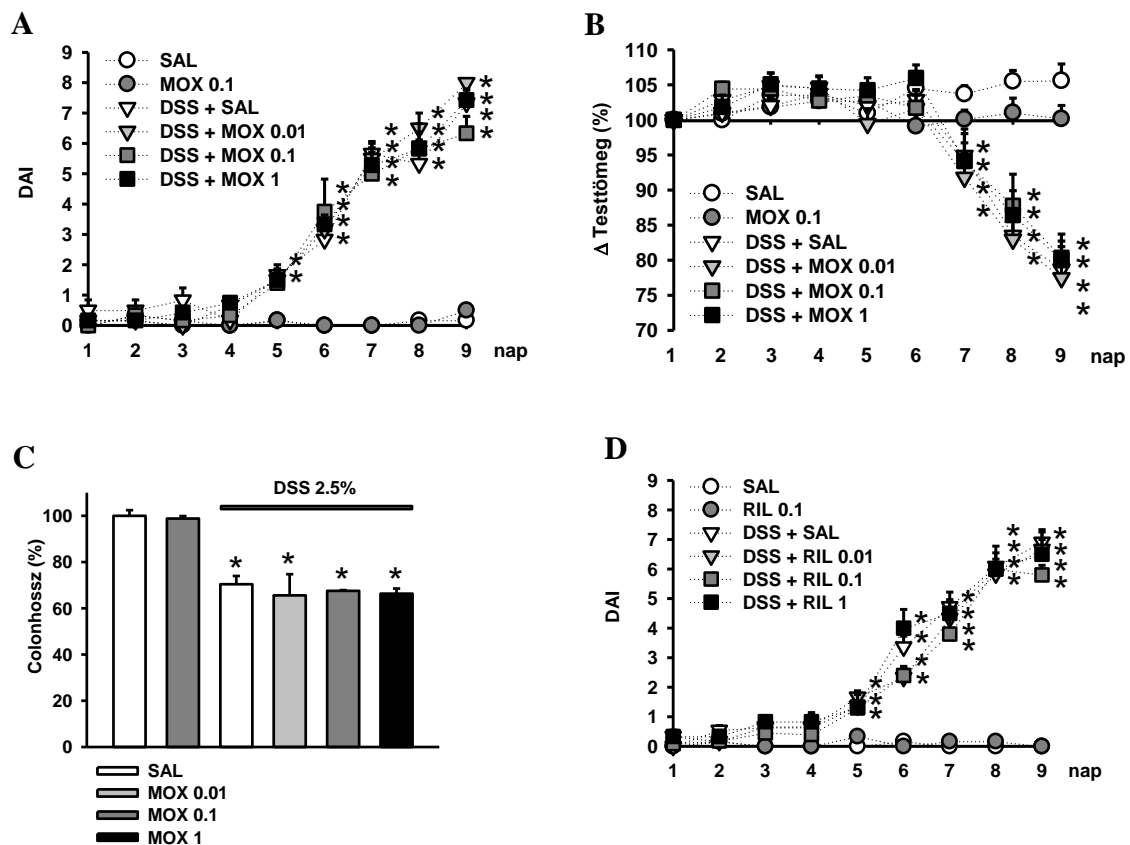
elérte a 60%-t (6. ábra D), ezért protokollunknak a 7 napig történő DSS-oldat expozíciót választottuk, a kísérletet pedig a 9. napon fejeztük be.

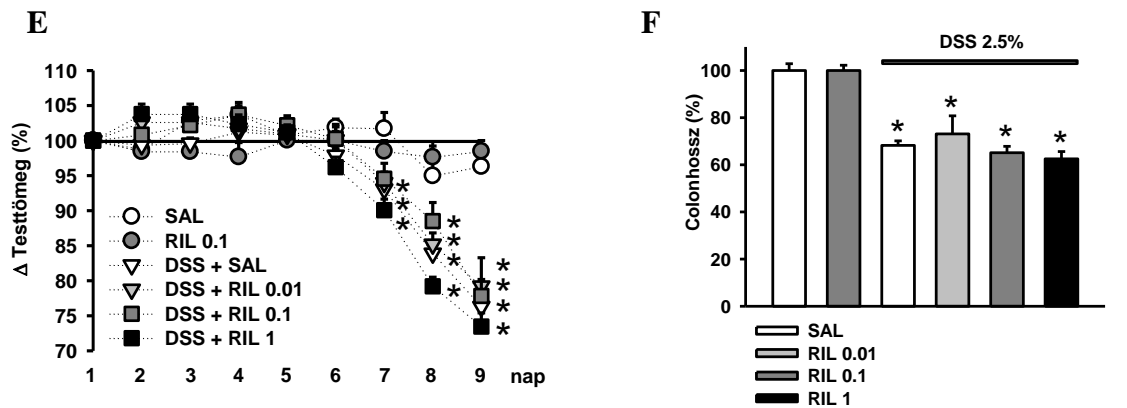


6. ábra. A 2.5%-os DSS-oldat indukálta colitis karakterizálása különböző protokollokkal. A DSS-oldatot az állatok 3 (n=6), 5 (n=12) illetve 7 (n=18) napig fogyasztották, míg a kontroll állatok csapvizet ittak. A 3 és 5 napos protokollokban a kísérleteket a 10. napon zártuk. A DSS-t 7 napig fogyasztó állatok esetében a kísérleteket három különböző időpontban fejeztük be, vagyis a 7., 9. és 10. napon (n=6/csoport). A colitis súlyosságát a DAI (A), testsúlycsökkenés (B), colon hosszának rövidülése (C) és a túlélési ráta (D) mutatja. Az ábrákon a csoport átlagok a szórásokkal vannak feltüntetve ( $\pm$  S.E.M.). \* $p < 0.05$  összehasonlítva a kontroll csoporttal Friedman-teszttel (A), kétutas ismételt méréses ANOVA-val (B) és egyutas ANOVA-val (C) Holm Sidak post hoc tesztel, valamint Kaplan-Meier tesztel (D).

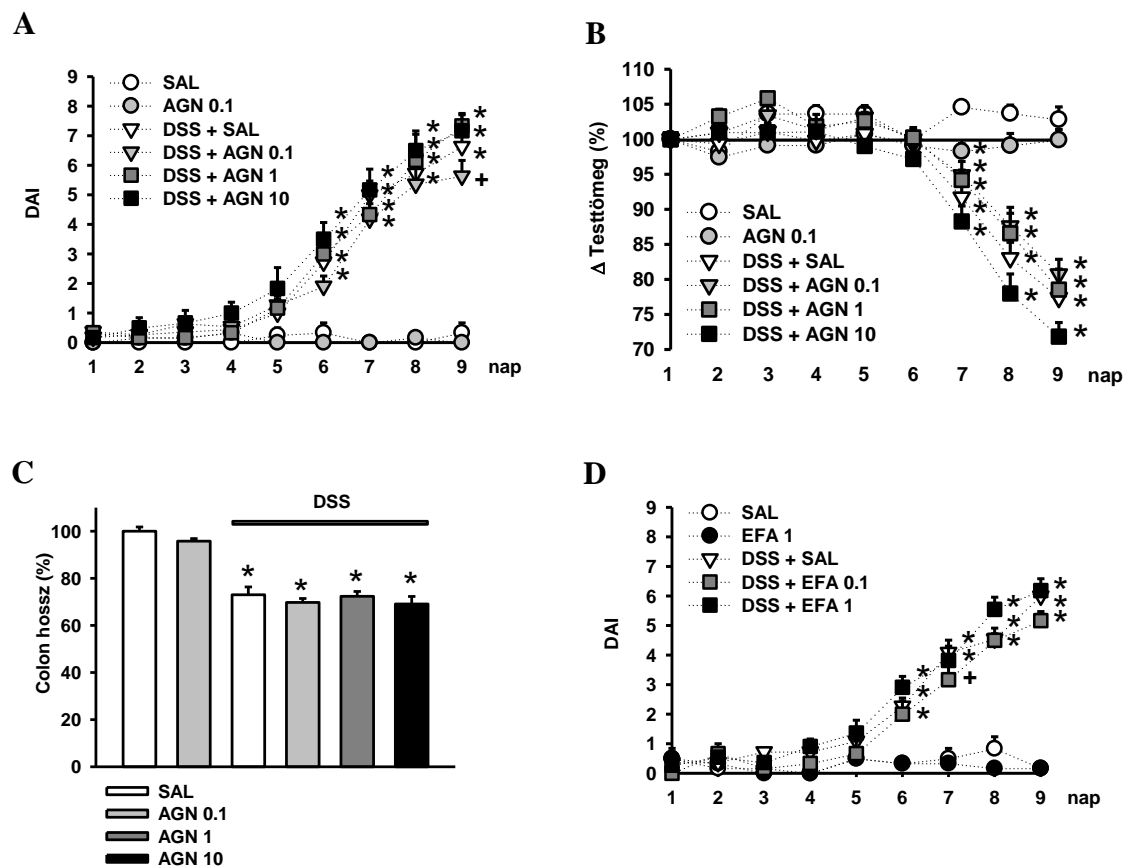
#### 4.2.2. Az IIR ligandok hatása a DSS által kiváltott colitisre

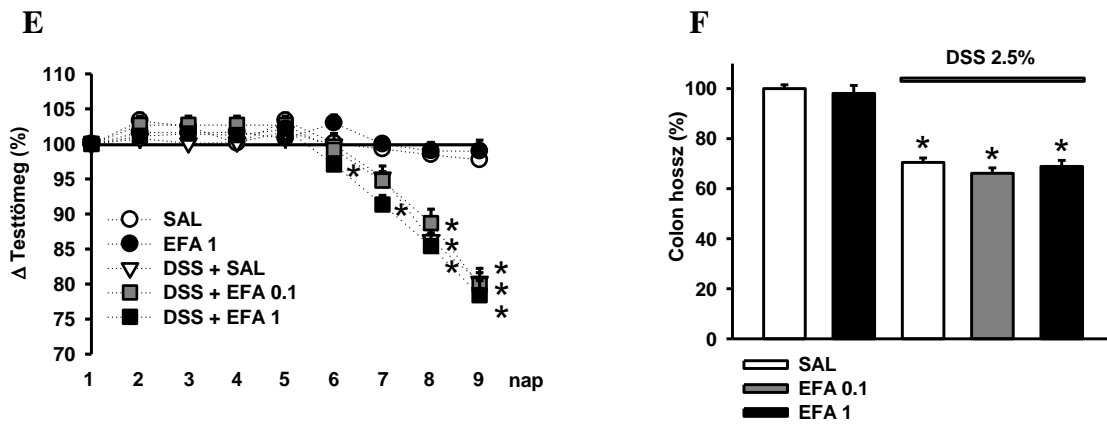
Az IIR iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR agonista moxonidin (0.01-1 mg/kg i.p., 7. ábra A-C) és rilmenidin (0.01-1 mg/kg i.p., 7. ábra D-F) napi egyszer adagolva nem befolyásolta a colitis makroszkópos tüneteit, mint a betegségindexet (DAI: 7. ábra A, D), a testsúlycsökkenést (7. ábra B, E), illetve a colon hosszának rövidülését (7. ábra C, F). A szelektív IIR ligand AGN 192403 (0.1-10 mg/kg i.p., 8. ábra A-C) és az  $\alpha_2$ -AR/IIR antagonistá efaroxan (0.1-10 mg/kg i.p., 8. ábra D-F) szintén nem hozott létre számottevő változást a gyulladás paraméterein. Habár az AGN 192403 legkisebb dózisa a 9. napon minimálisan csökkentette a DAI-t a kontroll csoporthoz képest, ez a változás nem volt dóziszfüggő. Egyik vegyületnek sem volt hatása a vizsgált paraméterekre a kontroll (vizet fogyasztó) csoportokban.





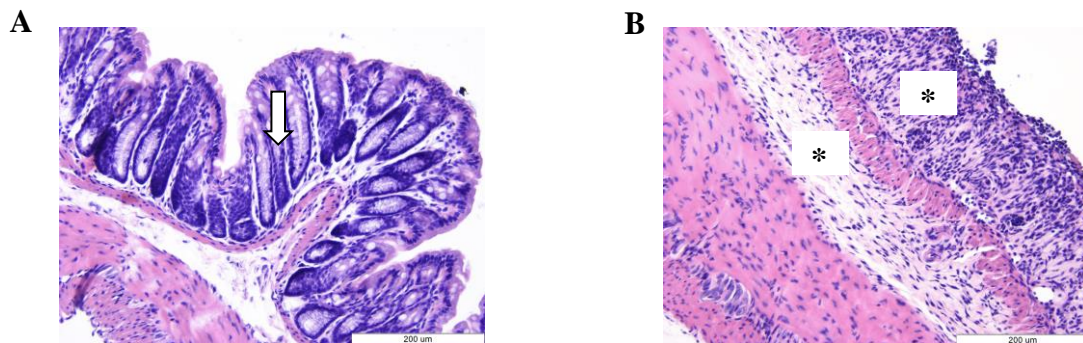
7. ábra. Moxonidin (MOX, 0.01-1 mg/kg, A-C) és rilmenidin (RIL, 0.01-1 mg/kg, D-F) hatása a 2.5%-os DSS-indukálta colitis modellre. A vegyületeket, illetve a fiziológiás sóoldatot (SAL) naponta 1x, i.p. injektáltuk. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$  S.E.M.) mutatják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL) kezelt csoporttal Friedman teszttel (A, D), kétutas ismételt mérése ANOVA-val (B, E), egyutas ANOVA-val Holm Sidak post hoc teszttel (C, F).

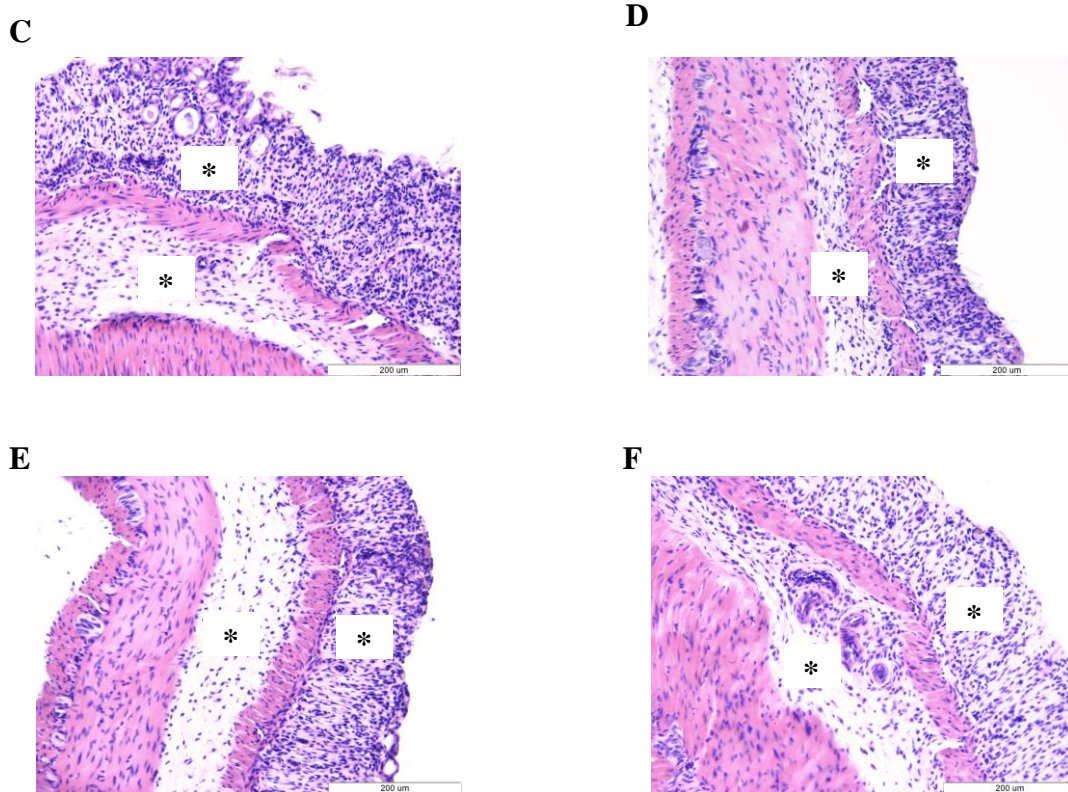




8. ábra. AGN192403 (AGN, 0.1-10 mg/kg, A-C) és efaroxan (EFA, 0.1 mg/kg-1 mg/kg, D-F) hatása a 2.5%-os DSS-indukálta colitisre. A vegyületeket, illetve a fiziológiás sóoldatot (SAL) naponta 1x, i.p. injektáltuk. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$  S.E.M.) mutatják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL), Friedman teszttel (A, D), kétutas ismételt mérések ANOVA-val (B, E), egyutas ANOVA-val Holm Sidak post hoc teszttel (C, F).

A továbbiakban az IIR ligandok DSS-colitisre kifejtett hatását szövettani vizsgálattal is elemeztem (9. ábra). A disztális colonból vett minták hisztológiai vizsgálatának eredményei a makroszkóposan látott képpel egybecsengtek. A csapvizet fogyasztó kontroll csoporthoz képest (9. ábra A) a DSS-oldattal kezelt állatok esetében az epiteliális réteg jelentős destrukciója volt látható ödémás submucosával, a kripták elvesztésével, továbbá mukózális és szubmukózális neutrofil granulocita infiltrációval (9. ábra B). A gyulladás mértéke az imidazolin ligandokkal kezelt csoportokban hasonló volt (9. ábra C-F).

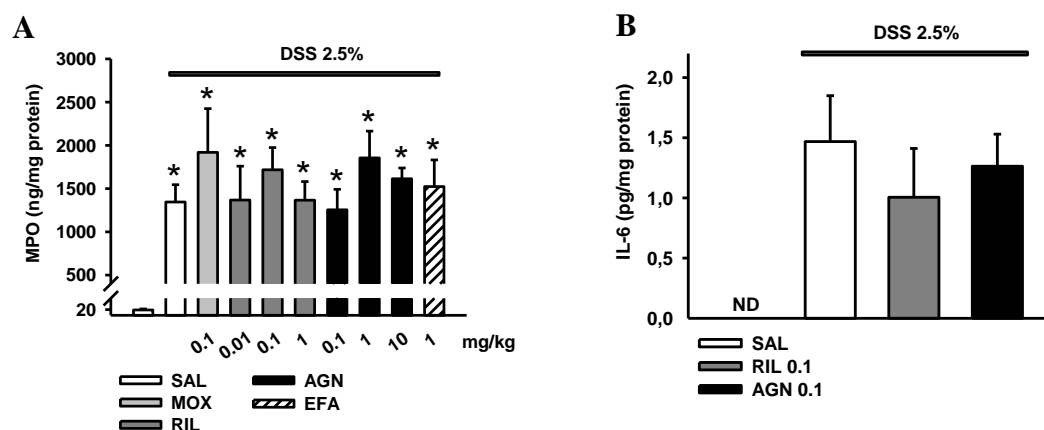




9. ábra. Disztális colon szegmensek hematoxinin-eozinnal festett reprezentatív szövettani fotói. A képek a következő kezeléseket mutatják: fiziológiás sóoldat + csapvíz (A), fiziológiás sóoldat + 2.5 % DSS (B), moxonidin (0.1 mg/kg i.p.) + 2.5 % DSS (C), rilmenidin (0.1 mg/kg i.p.) + 2.5 % DSS (D), AGN 192404 (0.1 mg/kg i.p.) + 2.5 % DSS (E), efaroxan (1 mg/kg i.p.) + 2.5 % DSS (F). A nyíl az ép kriptákat mutatja a kontroll csoportban, míg a csillagok az erőteljes neutrofil granulocita infiltrációt jelzik a mukózális és szubmukózális rétegben. Mérték: 200 µm.

További vizsgálataim során látható volt, hogy a 2.5%-os DSS-oldat hatására (a kontroll csoporthoz képest 100x-ra) megnövekedett a disztális colon MPO tartalma (10. ábra A), amely jelzi a neutrofil granulocita beáramlását (mint az a szövettani képeken látható). Azonban ezt az értéket egyik IR ligand sem befolyásolta. Emellett vérszérum mintákat vettem a fiziológiás sóoldattal, rilmenidinnel (0.1 mg/kg) és AGN 192403-mal (0.1 mg/kg) kezelt csoportokból az IL-6 szintjének meghatározására. A kontroll állatokban a proinflammatorikus IL-6 szintje mérhetetlenül alacsony volt, ez a DSS-oldatot fogyasztó állatokban jelentősen megemelkedett, viszont sem a rilmenidin, sem az AGN 192403-mal történő kezelés nem csökkentette a szintjét (10. ábra B).





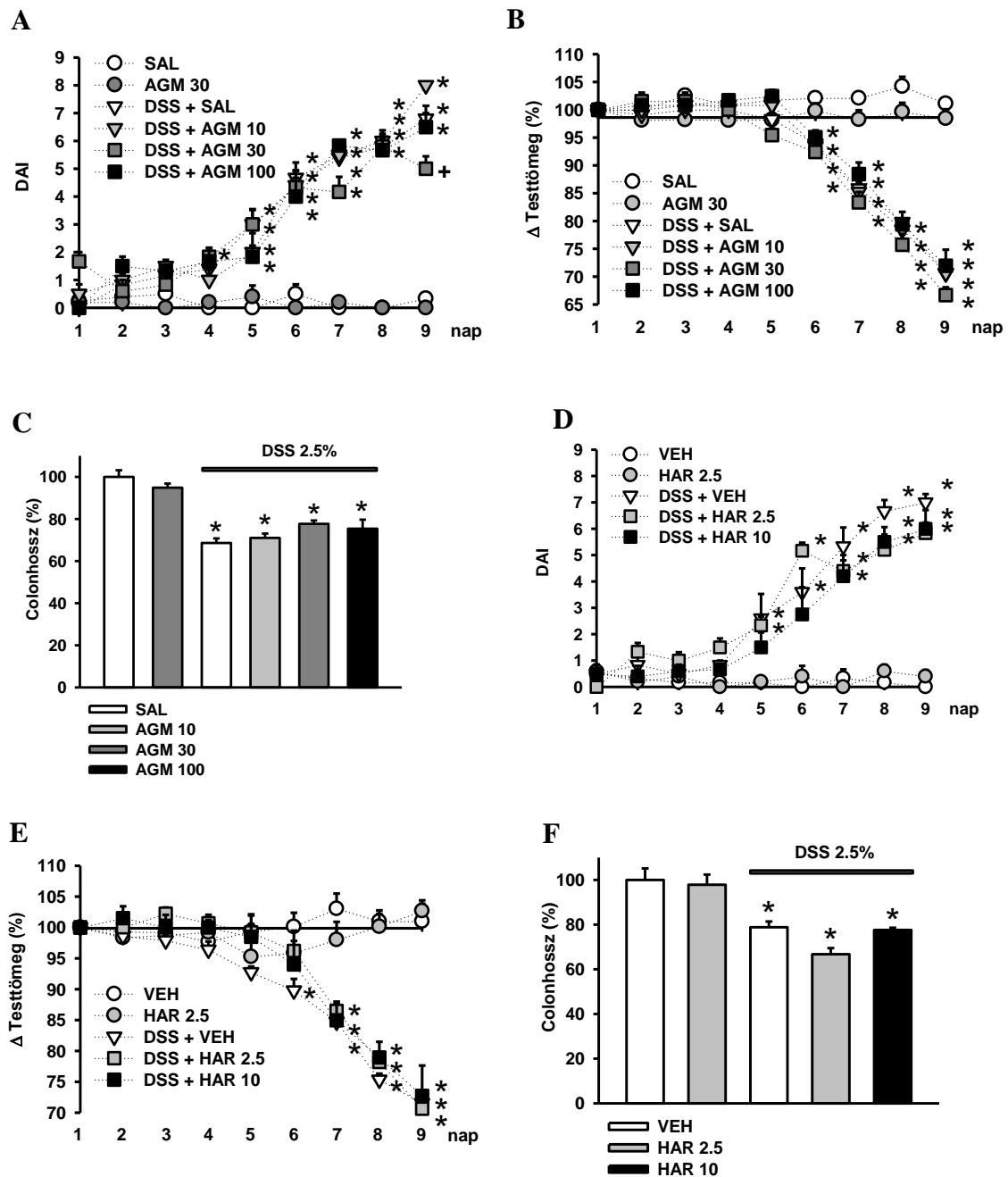
10. ábra. A szintetikus IIR ligandok hatása a disztális colon MPO és IL-6 szintjére 2.5%-s DSS-indukálta colitis modellben.

A: moxonidin (MOX, 0.1 mg/kg), rilmenidin (RIL, 0.01-1 mg/kg), AGN 192403 (AGN, 0.1-10 mg/kg) és efaroxan (EFA, 1 mg/kg) hatása a DSS-által megnövelt MPO szintekre. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják (n=6, kivéve DSS + SAL: n=13). \* $p < 0.05$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL) kezelt csoporttal, egyutas ANOVA-val Holm Sidac post hoc tesztel.

B: rilmenidin (RIL, 0.1 mg/kg) és AGN 192403 (AGN 0.1 mg/kg) hatása a szérumban IL-6 szintjére. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják (n=5). Statisztikának a DSS-oldatot fogyasztó csoportok között egyutas ANOVA-t használtunk Holm Sidac post hoc tesztel. A szérumban IL-6 szint a fiziológiás sóoldattal kezelt (SAL) és csapvizet fogyasztó csoportban a detektálható érték alatt volt (ND – nem detektálható).

#### **4.2.3. Az endogén imidazolin ligandok hatása a DSS-indukálta colitisre**

A továbbiakban két endogén imidazolin ligand, az agmatin (10-100 mg/kg i.p.) és a harman (2.5-10 mg/kg per os) hatását vizsgáltam a DSS által kiváltott colitis lefolyására. Mint ahogy a 11. ábra mutatja, az endogén imidazolin ligandok nem befolyásolták a DSS-colitis lefolyását, a kísérlet során kapott eredmények hasonlóak voltak a szintetikus ligandok eredményeivel. Habár a 30 mg/kg-os agmatin a 9. napon csökkentette a DAI-t (11. ábra A), ez a hatás nem volt dózisfüggő és nem befolyásolta a többi gyulladásos paramétert (11. ábra B, C). Sem az agmatinnak, sem a harmannak (vagy a vehikulumnak) önmagában nem volt hatása a vizsgált paraméterekre a csapvizet fogyasztó csoportban.

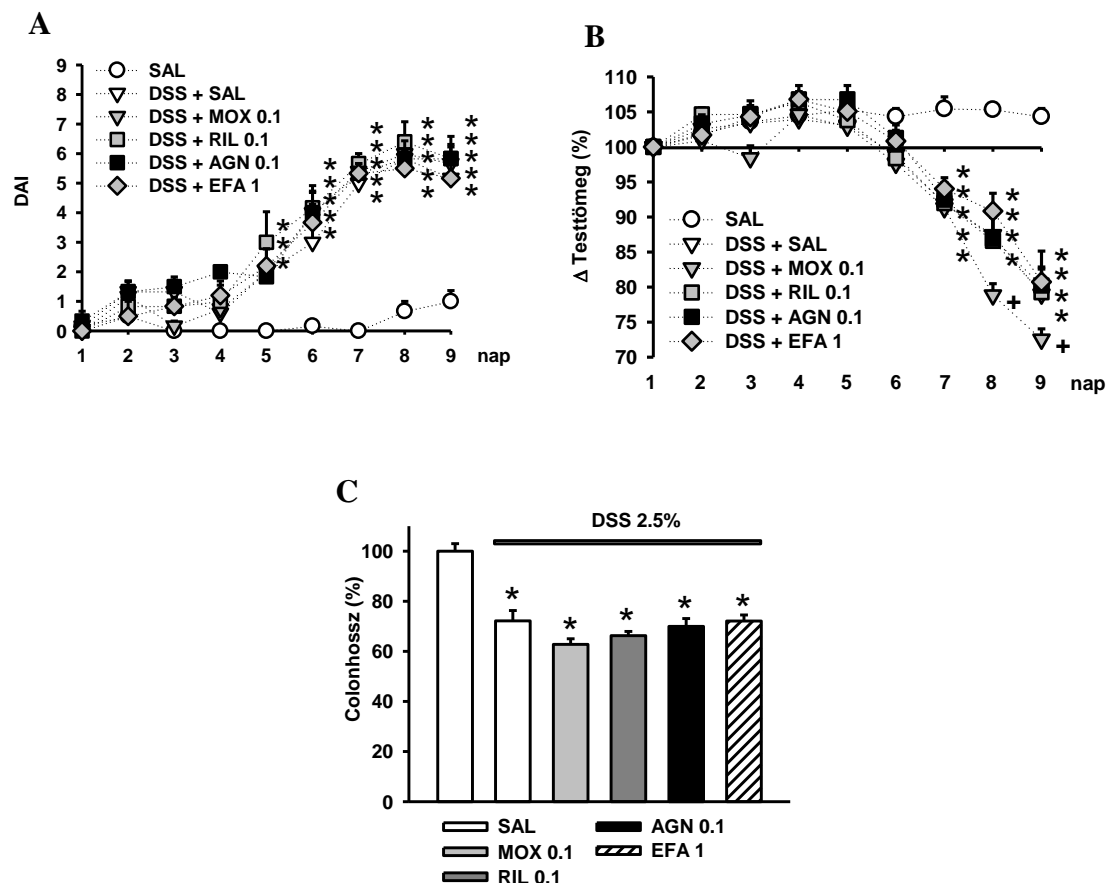


11. ábra. Az endogén imidazolin ligand agmatin és harman hatása a 2.5%-s DSS-indukálta colitisre. Az agmatin (AGM, 10-100 mg/kg, A-C), a fiziológiai sóoldat (SAL) i.p., míg a harman (HAR, 2.5-10 mg/kg, D-F) és vehikuluma (VEH, 1.7%-os ecetsav) intragasztrikus kanül segítségével volt injektálva. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ ). A statisztikai analízishez Friedman tesztet (A, D), kétutas ismételt méréses ANOVA-t (B, E) és egyutas ANOVA-t használtunk (C, F) Holm

Sidak post Hoc tesztel. \* $p < 0.05$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL), harman esetben a vehikulummal (VEH) kezelt csoporttal.

#### 4.2.4. A szintetikus IR ligandok hatása a DSS-indukálta colitisre, napi 2x adagolva

A fentiekén túlmenően vizsgáltam, hogy az IR ligandok napi kétszeres adagolása befolyásolja-e a colitis kimenetelét. A DSS-által indukált colitis gyulladásos paramétereit változatlanok maradtak mind a rilmenidin (0.1 mg/kg), az AGN 192403 (0.1 mg/kg) és az efaroxan (1 mg/kg) esetében is a napi kétszeri i.p. injektálást követően (12. ábra). A moxonidin (0.1 mg/kg) súlyosbította az állatok súlycsökkenését (12. ábra B), viszont a kapott hatás független volt az állatok táp- és vízfogyasztásától (nincs ábrázolva). Továbbá nem volt változás a DAI-ban és a colon rövidülésben sem.



12. ábra. A szintetikus IR agonisták és antagonisták hatása a 2.5%-s DSS-indukált colitis makroszkópos jeleire napi 2x injektálva. Az ábrákon a ligandok hatása látható a DAI-ra (A), a testsúlycsökkenésre (B), illetve a colonhosszra (C). A feltüntetett értékek az átlagot

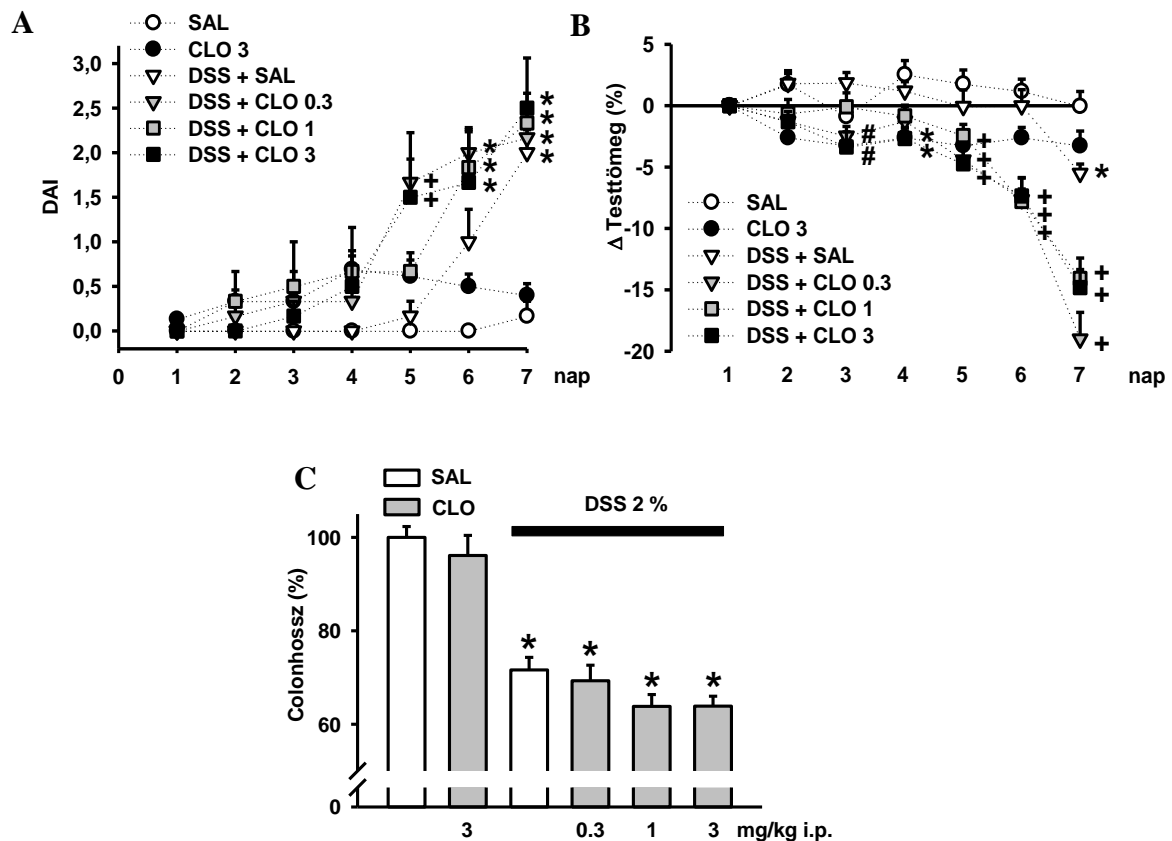
és a szórás ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). A statisztikai analízishez Friedman tesztet (A), kétutas ismételt méréses ANOVA-t (B) és egyutas ANOVA-t használtunk (C) Holm Sidac post Hoc tesztel. \* $p<0.05$  összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal (SAL), + $p<0.05$  összehasonlítva a DSS+SAL csoporttal.

#### **4.2.5. A DSS-oldat okozta gyulladás karakterizálása az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálatához használt colitis modellben**

A következő kísérletsorozatban az  $\alpha_2$ -AR-k szerepét vizsgáltam egér DSS-indukálta colitis modellben. Az IR ligandokkal végzett korábban ismertetett eredményeim alapján (moxonidin súlyosbította 2.5% DSS-colitis esetén a súlycsökkenést, ld. 4.2.4. alfejezet), felmerült, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k súlyosbítják a DSS-colitis tüneteit. Ezért jelen kísérleteimben egy kevésbé súlyos gyulladást kiváltó protokollt alkalmaztam, melyben az egerek a kísérlet teljes időtartama alatt, vagyis 7 napig itták a 2%-s DSS oldatot, majd az állatok a 8. nap reggelén lettek túlaltatva. A DSS jelen esetben is kiváltotta a gyulladás makroszkópos tüneteit, vagyis hasmenés, véres széklet, súlycsökkenés és colonrövidülés jelentkezett, viszont a tünetek összességében enyhébbek voltak, mint az előző projektben alkalmazott DSS protokoll esetén. A kísérletek során egyformán kerültek alkalmazásra nőstény és hím állatok, figyelve arra, hogy az ivararány minden csoportban hasonló legyen. Kísérleteim során nem tapasztaltam különbséget a DSS-colitis lefolyásában a hímnemű és a nőstény állatok között, a DAI érték, a súlycsökkenés, a colonrövidülés hasonló volt mind a két csoportban (nincs ábrázolva).

#### **4.2.6. A clonidin hatása a DSS-indukálta colitis lefolyására WT egerekben**

Az  $\alpha_2$ -AR iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R agonista clonidin (0.3-3 mg/kg i.p.) napi adagolása enyhén súlyosbította a DSS-indukálta colitis tüneteit. A clonidin gyorsította a gyulladásos tünetek kialakulását, mely egyrészt megnyilvánult a DAI érték DSS-kontrollhoz képesti korábbi növekedésében, másrészt szignifikánsan növelte a súlyvesztést (dózisfüggetlen módon), viszont nem volt hatása a colon rövidülésére (13. ábra A-C).

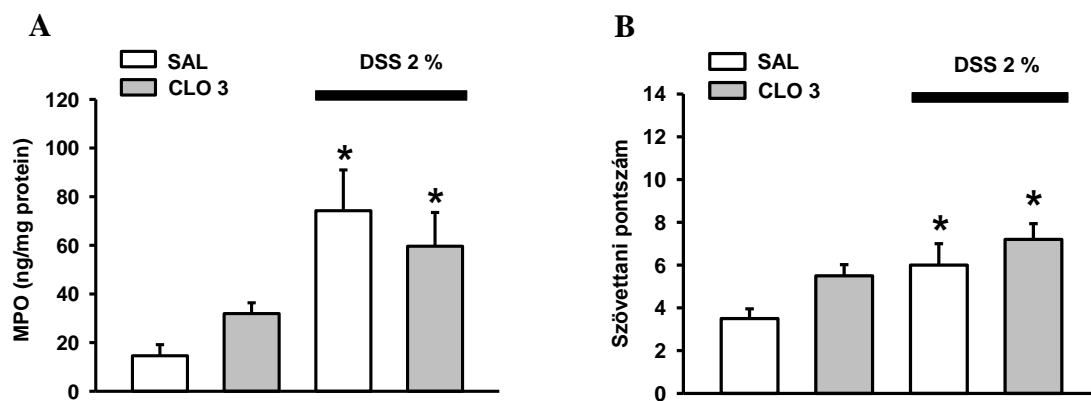


13. ábra. Clonidin (CLO 0.3-3 mg/kg) hatása WT egérben a 2%-s DSS-indukálta colitisre, mint a DAI értékre (A), a súlycsökkenésre (B) és a colonhosszra (C). A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a SAL, # $p<0.05$  összehasonlítva a DSS+SAL, +  $p<0.05$  összehasonlítva a SAL és a DSS+SAL csoporttal. A statisztikához Friedman tesztet (A), kétutas ismételt méréses (B) és egyutas ANOVA (C) módszert alkalmaztunk Holm-Sidak post hoc tesztel.

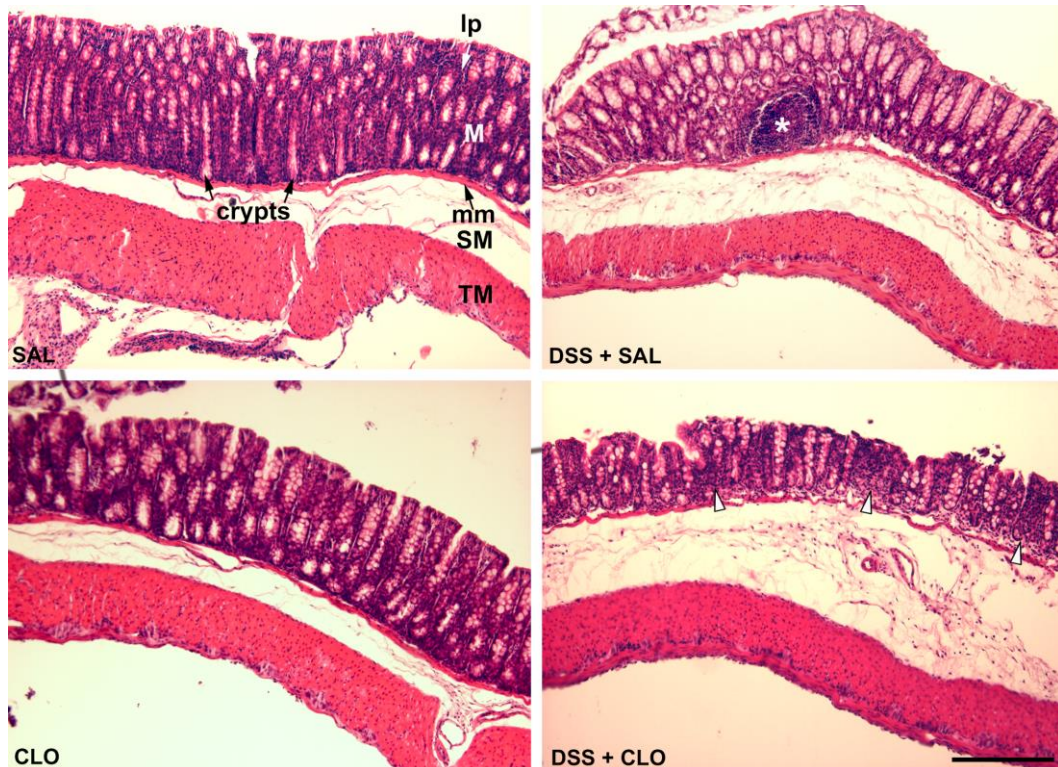
A továbbiakban vizsgáltam a clonidin hatását a disztális colon MPO szintjére (14. ábra), illetve a mikroszkópos képre egyaránt (15. ábra). A DSS kezelés hatására a colon MPO tartalma kb. ötszörösére növekedett (szemben a 2.5%-s DSS-colitis protokollban, ahol a növekedés mértéke nagyjából százszoros), viszont ezt nem befolyásolta az i.p. adagolt clonidin. A szövettani vizsgálatok során a DSS enyhe szöveti destrukciót okozott, a gyulladás elsősorban a nyálkahártyára terjedt ki (15. ábra). A hisztológiai képre a gyulladásos sejtek helyi felhalmozódása, a kripták irreguláris elrendeződése, a basalis rész részleges elvesztése, valamint súlyosabb esetben felszínes epiteliális eróziók voltak

jellemzőek. A gyulladásos sejtek főleg limfocitákból és makrofágokból álltak, esetenként neutrofil granulociták is megjelentek. Bár a clonidin legnagyobb dózisa (3 mg/kg) egyes esetekben enyhén súlyosbította a gyulladás jeleit (például epiteliális károsodást vagy submucosális ödémát), a teljes szövettani score nem különbözött a DSS-kontroll csoporthoz viszonyítva (14. ábra B, 15. ábra).

A csapvizet fogyasztó, clonidinnel kezelt állatok nem mutatták a gyulladás jeleit és nem volt náluk szignifikáns súlyvesztés (14. ábra, 15. ábra, 13. ábra B).



14. ábra. Clonidin hatása a colon MPO szintjére és a szövettani pontszámra DSS-indukálta colitis esetén. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \*,  $p<0.05$  összehasonlítva a SAL csoporttal egyutas ANOVA (A) és Kruskal Wallis módszerrel (B), majd Holm-Sidak post hoc tesztel.

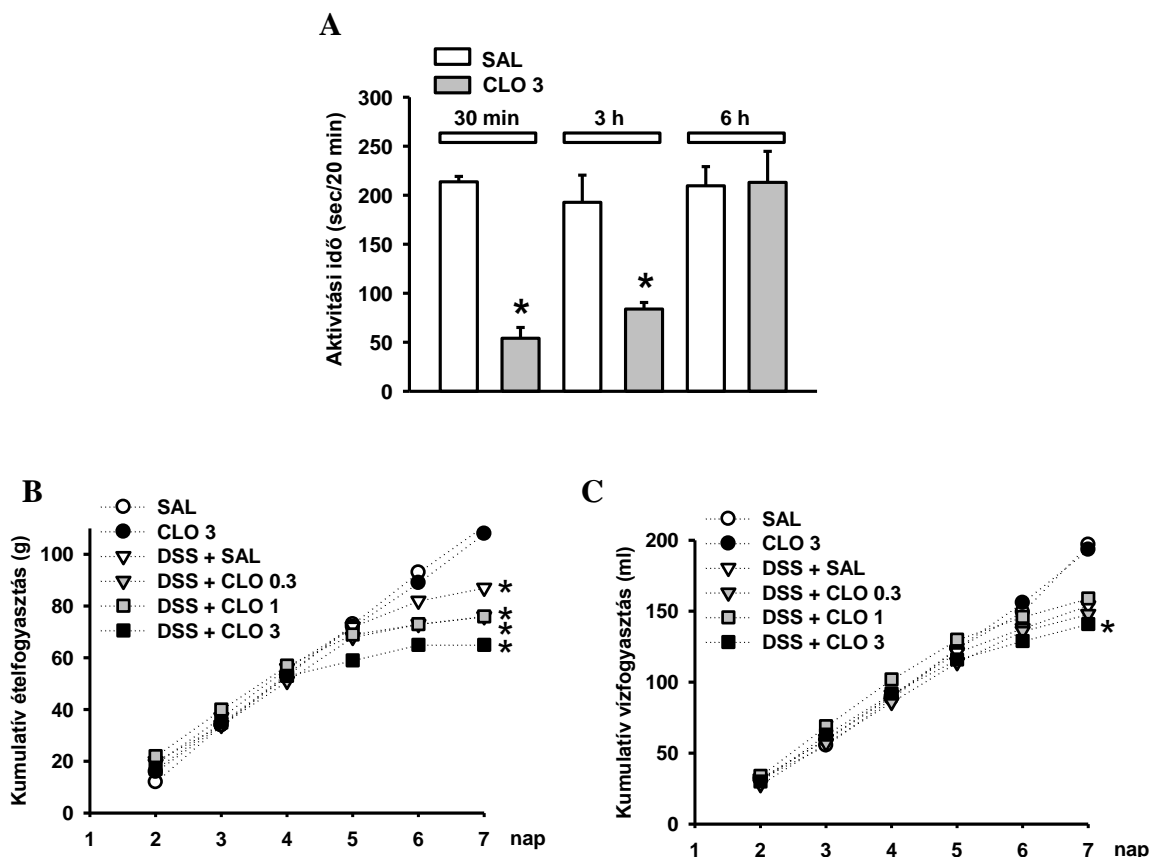


15. ábra. Reprezentatív szövettani képek a disztális colonról, hematoxin-eozin festéssel. A képek a következő kezeléseket mutatják: fiziológiás sóoldat i.p. + csapvíz (SAL), 3 mg/kg clonidin + csapvíz (CLO), fiziológiás sóoldat i.p. + 2 % DSS (DSS+SAL), 3 mg/kg clonidin i.p. + 2 % DSS (DSS+CLO). A gyulladás szövettani jelei a DSS+SAL csoportban kerültek leírásra (ld. 14. ábra B). A clonidin i.p. adása enyhén súlyosbította a gyulladás egyes jeleit (pl. a lamina propria lymphocytás infiltrációja nyíllal jelölve). \*: nyálkahártya fokális limfatikus infiltrációja; lp: lamina propria; TM: tunica muscularis; M: tunica mucosae; mm: muscularis mucosae; SM: tela submucosa. Mérték: 250  $\mu$ m.

#### **4.2.7. A clonidin hatása az étel- és vízfogyasztásra, illetve a lokomotoros aktivitásra WT egerekben**

Bár a clonidin nem befolyásolta számottevően a csapvizet fogyasztó egerek súlyát, felmerült a kérdés, hogy a DSS+clonidin kezelt csoportban tapasztalt jelentős súlyvesztés hátterében szerepet játszhatnak-e egyéb hatások a bélgyulladás súlyosbításán kívül. Egyik lehetséges ok, hogy a clonidin direkt, vagy indirekt (szedatív) hatással csökkenti az egerek étel- és vízfogyasztását. A szedatív hatás kizárása céljából

az állatok lokomotoros aktivitását 20 percen keresztül 3 különböző időpontban (a fiziológiás sóoldatot, ill. a clonidin injekciót követő 30 perc, 3 óra és 6 óra múlva) monitoroztam 3 egymást követő napon megismételve (5-7. nap). A kapott eredményeim alapján a legmagasabb clonidin dózissal kezelt (3 mg/kg i.p.) csoportban az egerek aktivitási ideje jelentősen csökkent a fiziológiás sóoldatot kapott állatokhoz viszonyítva, viszont ez a hatás relatíve rövid ideig tartott és 6 óra múlva a hatás teljesen megszűnt (16. ábra A). Továbbá a kumulatív étel- és folyadékfogyasztás a kezelés első napjaiban azonos volt a különböző csoportoknál, viszont a colitis kifejlődésével a DSS-t fogyasztó állatok esetében a táplálék és folyadékfogyasztás fokozatosan csökkent (a colitis súlyosságával arányosan). A DSS+clonidinnel kezelt állatok esetében a csökkent étel- és vízfogyasztás valamivel kifejezettebb volt, azonban nem különbözött szignifikánsan a csak DSS-sel kezelt csoportban mért értékektől (16. ábra B, C).



16. ábra. Clonidin (CLO) hatása a lokomotoros aktivitásra (A), a kumulatív étel- és vízfogyasztásra WT egérben (B, C).

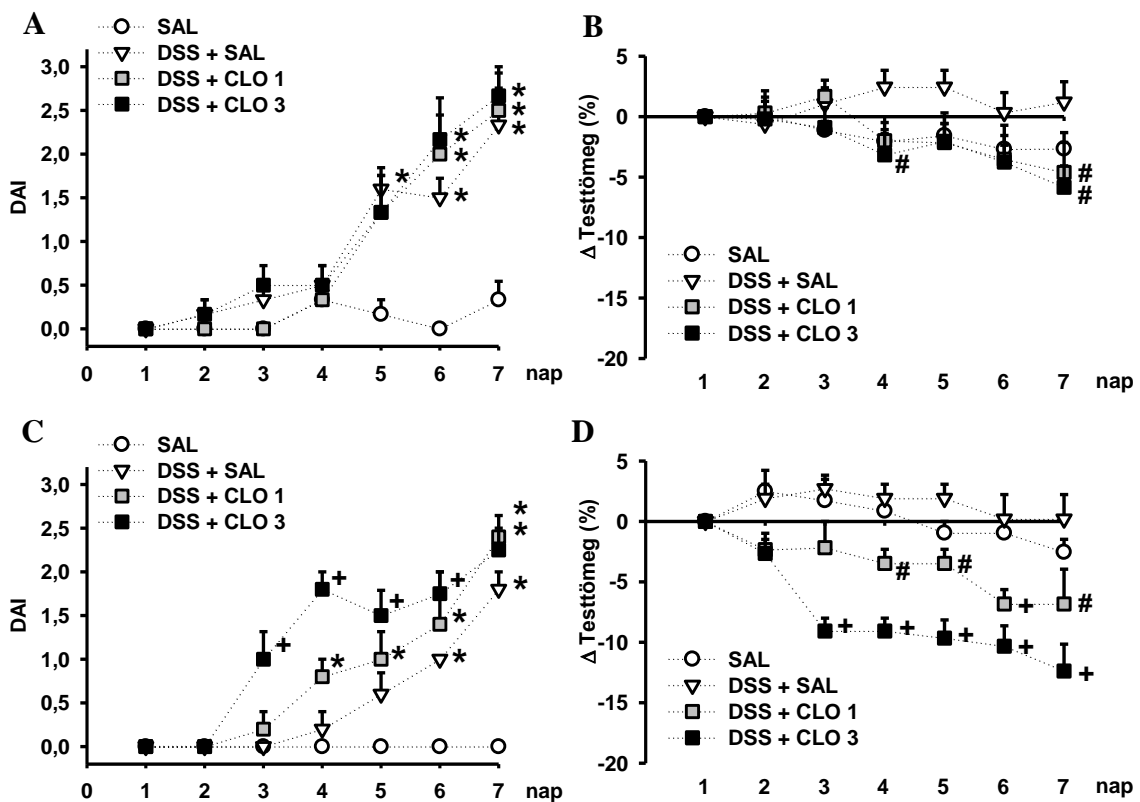


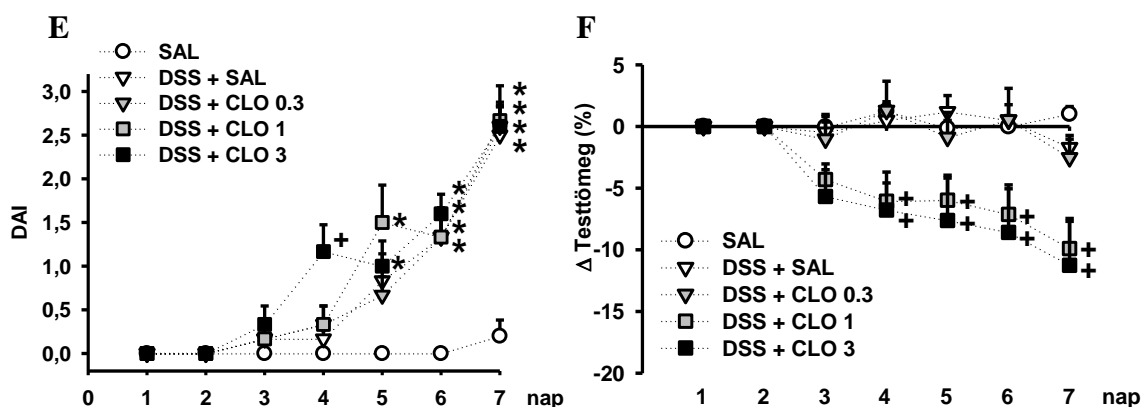
A: A clonidin (CLO, 3 mg/kg i.p.) hatása a lokomotoros aktivitásra. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a SAL csoporttal Student's t-tesztel.

B, C: A clonidin hatása a kumulatív étel- és vízfogyasztásra. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \*  $p<0.05$  összehasonlítva a SAL csoporttal egyutas ANOVA-val, Holm-Sidak post hoc tesztel.

#### 4.2.8. A clonidin hatása a DSS-indukálta colitisre $\alpha_2$ -AR szubtypus KO egerekben

Az  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR szubtypus KO egerek esetében a clonidin hasonló hatást mutatott, mint WT egereknél, vagyis a vegyület súlyosbította a gyulladás tüneteit, egyrészt hamarabb emelkedett a DAI pontszáma, másrészt fokozta a súlyvesztést a DSS-kontroll csoporthoz képest (17. ábra C, D, E, F). Ezzel szemben a clonidin nem gyorsította  $\alpha_{2A}$ -AR esetében a DAI növekedését és szignifikánsan kisebb súlycsökkenést hozott létre a WT egerekhez viszonyítva ( $-5.8 \pm 1.7\%$  összehasonlítva  $-14.8 \pm 1.5\%$   $p<0.001$ ; 17. ábra A, B).

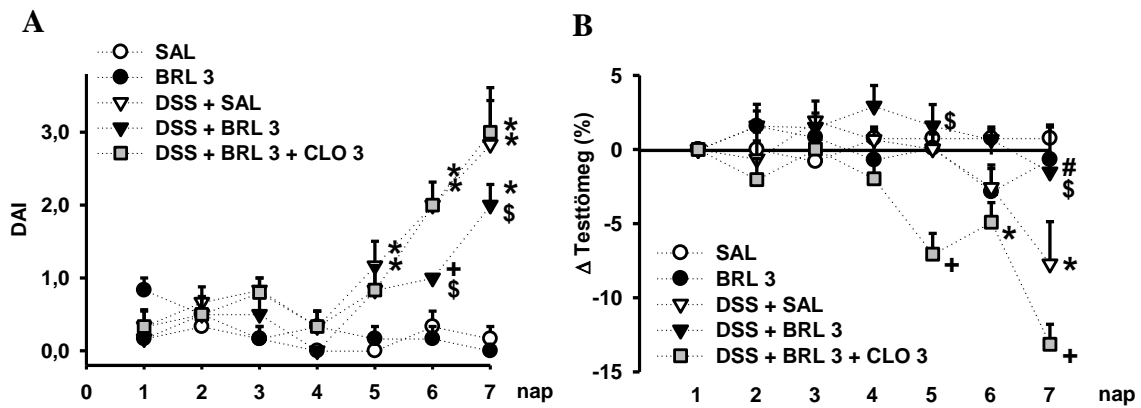




17. ábra. Clonidin (CLO) hatása a DSS-colitisre  $\alpha_{2A}$ - (A, B),  $\alpha_{2B}$ - (C, D) és  $\alpha_{2C}$ -AR (E, F) KO egerek esetében. A vegyületeket naponta i.p. adagoltam, a DAI értéket (A, C, E) és a súlycsökkenést naponta mértem (B, D, F). A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $\alpha_{2A}$ -AR KO: n=6/csoport,  $\alpha_{2B}$ -AR KO n=5/csoport,  $\alpha_{2C}$ -AR KO: n=5/kontroll csoport, többi csoport esetében n=6). \*p<0.05 összehasonlítva a SAL csoporttal, #p<0.05 összehasonlítva a DSS+SAL csoporttal, +p<0.05 összehasonlítva a SAL és a DSS+SAL csoporttal egyaránt. A statisztikához Friedman tesztet (A, C, E) és kétutas ismételt méréses ANOVA módszert alkalmaztunk (B, D, F) Holm-Sidak post hoc tesztel.

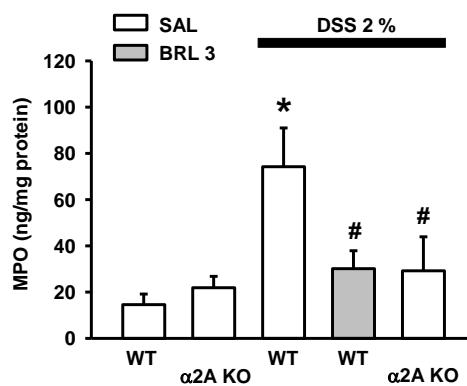
#### **4.2.9. A BRL 44408 hatása a DSS-indukálta colitisre WT egerek esetében**

Mivel  $\alpha_{2A}$ -AR génkiütött egerek esetében szignifikánsan csökkent a clonidin súlyosbító hatása a colitisre, ezért felmerült a kérdés, hogy ezen receptor szubtípus farmakológiai gátlása képes-e védelmet létrehozni a DSS-colitissel szemben. A szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL 44408 napi adagolása (3 mg/kg i.p.) szignifikánsan csökkentette a colitis tüneteit és a súlyvesztést is mérsékelte. Ez a védő hatás eltűnt, ha a BRL 44408-t clonidinnel kombináltuk (18. ábra A, B).



18. ábra. A BRL 44408 (BRL) hatása a DAI értékre (A), súlycsökkenésre (B) DSS-colitis esetén. A vegyületeket naponta i.p. injektáltuk. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a SAL, # $p<0.05$  összehasonlítva a DSS+SAL, + $p<0.05$  összehasonlítva a SAL és DSS +SAL, \$ $p<0.05$  összehasonlítva a DSS+BRL3+CLO3 csoporttal Friedman teszttel (A) és kétutas ismételt mérés ANOVA módszerrel Holm-Sidak post hoc teszttel (B).

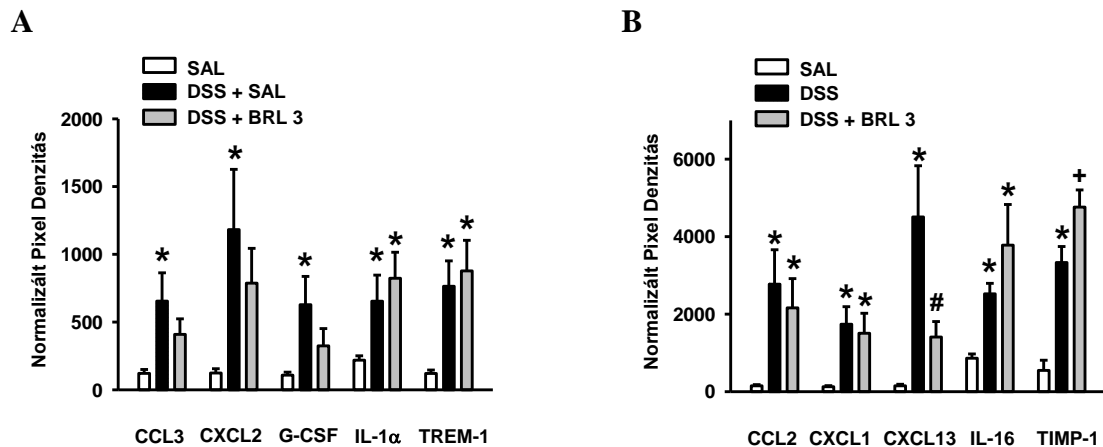
A továbbiakban összehasonlítottuk a colon MPO szintjének változásait a DSS-colitisben WT és  $\alpha_{2A}$ -AR KO egerek felhasználásával, illetve a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL 44408-l történt kezelés mellett. Az MPO szint szignifikánsan alacsonyabb volt a BRL 44408-l hatására, hasonló eredményt figyelhetünk meg az  $\alpha_{2A}$ -AR KO állatoknál (19. ábra).



19. ábra. A BRL4408 hatása a colon MPO szintjére WT és  $\alpha_{2A}$ -AR KO egér esetében. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \* $p<0.05$  összehasonlítva a SAL (WT és  $\alpha_{2A}$ -AR KO egérrel, melyek csapvizet fogyasztottak),

# $p < 0.05$  összehasonlítva a DSS+SAL (WT egérrel) egyutas ANOVA Holm Sidak post hoc teszttel.

A BRL 44408 gyulladáscsökkentő hatásának a mélyebb megértése céljából a colon gyulladásos folyamatokban szerepet játszó citokin és kemokinprofilját analizáltam. Ennek alapján elmondható, hogy a DSS-oldat hatására számos citokin és kemokin szöveti szintje megemelkedett. A DSS-hatására megemelkedett „C-X-C motif ligand 13” (CXCL-13) kemokin szintje jelentősen lecsökkent a BRL44408-l kezelés hatására. Továbbá a DSS szignifikánsan megemelte a „C-C motif ligand 3” (CCL3), a CXCL2, valamint a granulocita-kolóniastimuláló faktor (G-CSF) szintjét a fiziológiás sóoldattal kezelt csoportban, de nem fokozta a szintjüket a BRL-el kezelt csoportban. Továbbá a DSS oldat megnövelte a metalloproteináz szöveti gátlója 1 (TIMP-1) szintjét, mely még tovább emelkedett a BRL 44408 kezelés mellett (20. ábra).



20. ábra. A BRL4408 hatása a colon citokin és kemokin szintjeire WT egérben DSS-colitis esetében. A szöveti citokin szintek mérése egér citokin panel segítségével történt. Minden pont esetében a pixel denzitást a referenciaponthoz (10,000) viszonyítottam. A feltüntetett értékek az átlagot és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják ( $n=6$ /csoport). \* $p < 0.05$  összehasonlítva a SAL (csapvizet fogyasztó), # $p < 0.05$  összehasonlítva a DSS+SAL, + $p < 0.05$  összehasonlítva a SAL és DSS +SAL csoporttal egyutas analízissel, Holm Sidak post hoc teszttel.

### **4.3. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában**

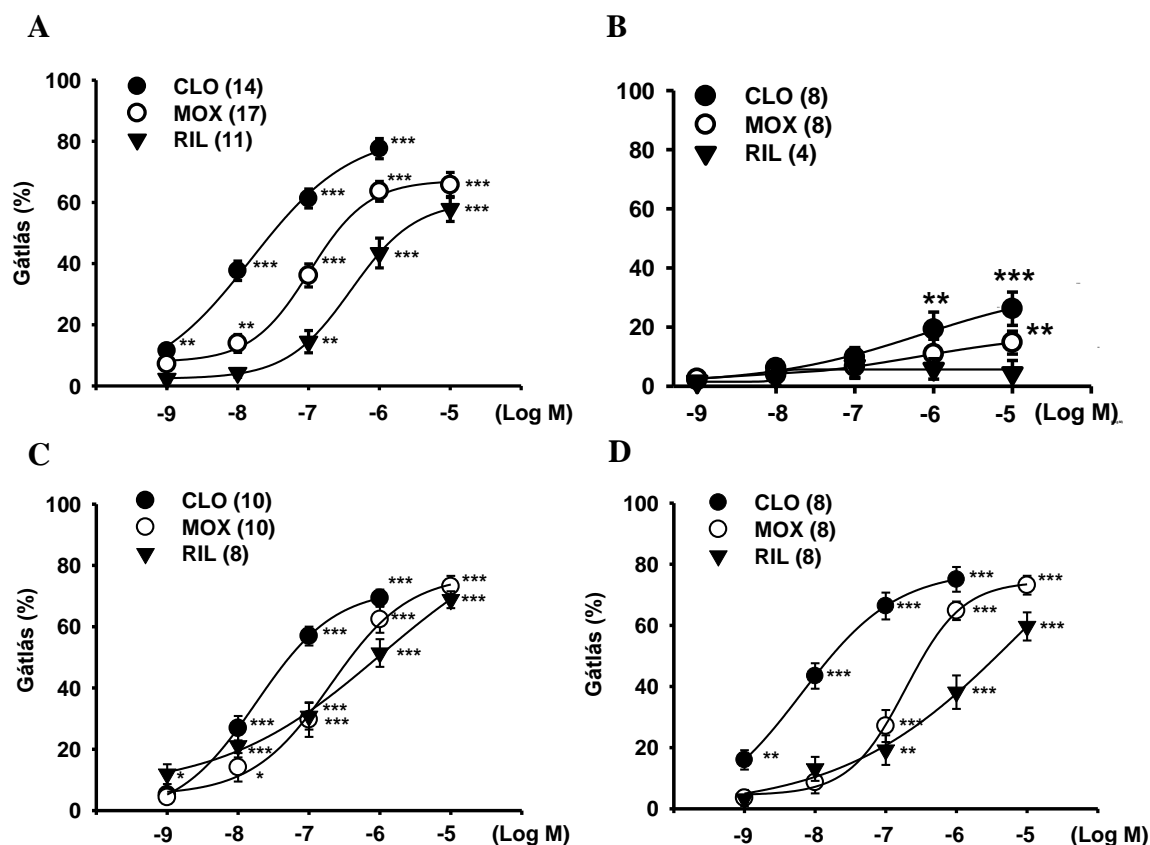
#### **4.3.1. Clonidin, moxonidin és rilmenidin hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra**

Mind a három kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R agonista vegyület koncentrációfüggően gátolta az EFS-indukálta gyomorkontrakciókat WT,  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR KO egérben (21. ábra A, C, D). A vizsgált agonisták közül a clonidin hatáserőssége volt a legnagyobb, amit a moxonidin, majd a rilmenidin követett (21. ábra A, C, D, ill. 1. táblázat).

$\alpha_{2A}$ -AR KO egérben jelentősen csökkent a fenti vegyületek gátló hatása a kolinerg kontrakciókra és csupán legnagyobb koncentrációban figyelhattunk meg enyhe gátlást a clonidin (10  $\mu$ M: 24.6%-os gátlás) és a moxonidin (10  $\mu$ M: 18.2 %-os gátlás) esetében (21. ábra B). A rilmenidin a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (10  $\mu$ M) sem hozott létre szignifikáns változást.

1. táblázat. Clonidin, moxonidin és rilmenidin gátló hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra WT,  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR KO egereken. <sup>a</sup>p<0.01, <sup>b</sup>p<0.001 összehasonlítva a WT,  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -KO egerekkel (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt).

	WT			$\alpha_{2A}$ -KO			$\alpha_{2B}$ -KO			$\alpha_{2C}$ -KO		
	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	n	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	n	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	n	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	n
Clonidin	83.2 ± 7.4	20.8 ± 6.2	14	24.6 ± 6.2 <sup>b</sup>	85.1 ± 31.5 <sup>a</sup>	8	74.8 ± 3.0	29.1 ± 6.5	10	77.5 ± 11.1	6.4 ± 1.2	8
Moxonidin	67.2 ± 4.7	103.8 ± 21.9	17	18.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	643.9 ± 13.9 <sup>b</sup>	8	76.9 ± 9.7	200.7 ± 84.0	10	69.9 ± 3.3	192.3 ± 29.9	8
Rilmenidin	60.9 ± 4.5	549.5 ± 121.1	11	nincs hatás		4	85.2 ± 7.8	537.3 ± 261.0	8	78.7 ± 7.8	754.8 ± 95.2	8



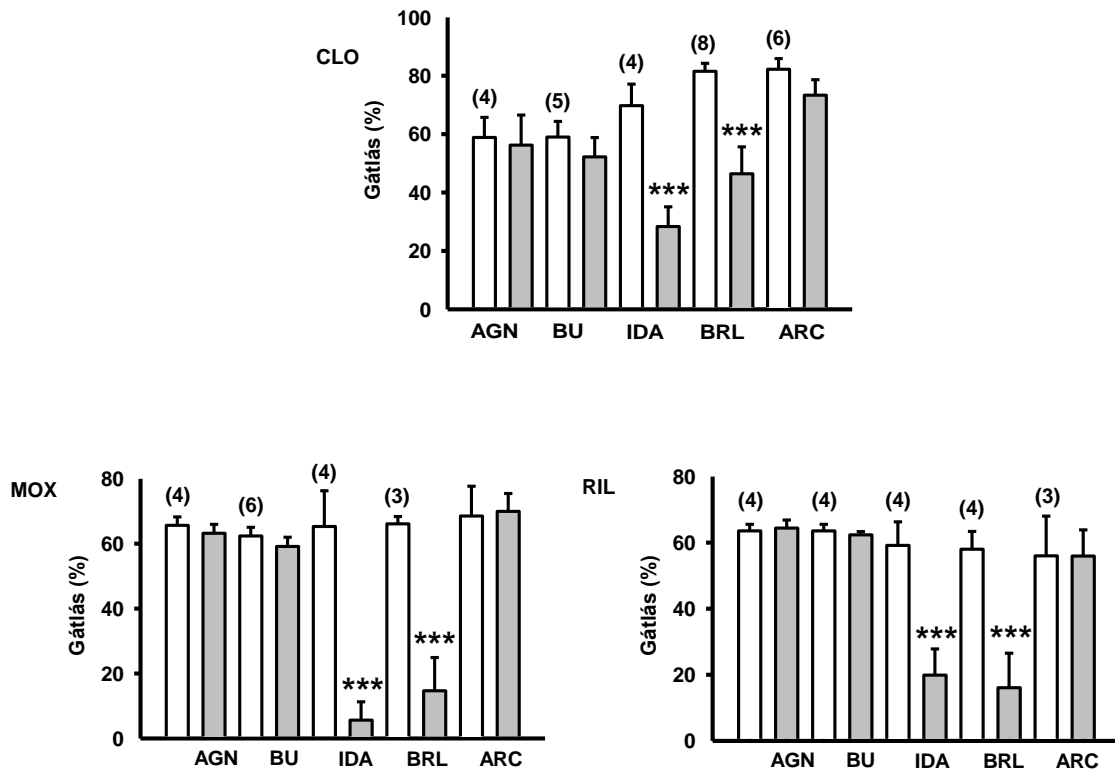
21. ábra. Clonidin (CLO), moxonidin (MOX) és rilmenidin (RIL) gátló hatása az EFS-indukálta kolinerg gyomorkontrakciókra WT (A),  $\alpha_{2A}$ - (B),  $\alpha_{2B}$ - (C), és  $\alpha_{2C}$ -KO (D) C57Bl/6 egérben. Zárójelben a kísérlet során felhasznált állatok elemszáma látható. Az agonistákat kumulatív módon adagoltam a szervfürdőkhöz növekvő koncentrációban, 5 perces időközönként. A koncentráció-hatás görbék egyes pontjai a kontrakciók amplitúdójának átlagát és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  a szervek alapkontrakciójával összehasonlítva (kétutas ismételt mérések ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt).

#### **4.3.2. Az $\alpha_2$ -AR és IR antagonisták hatása a clonidin, moxonidin és rilmenidin kontrakció gátló hatására**

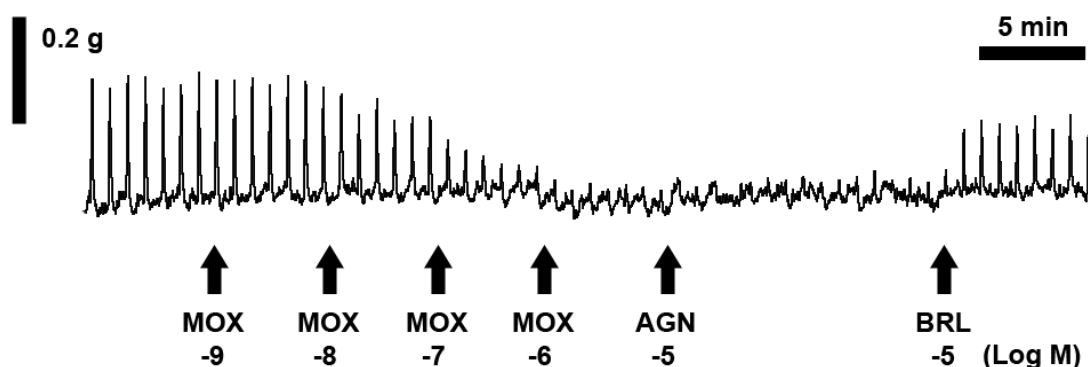
A kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonista idazoxan valamint a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonista BRL 44408 jelentős mértékben csökkentette a clonidin (1  $\mu$ M), moxonidin (10  $\mu$ M) és rilmenidin (10  $\mu$ M) által kifejtett gátló hatást a kolinerg gyomorkontrakciókra WT C57Bl/6 egérben. Ezzel szemben a szelektív I1R ligand AGN192403, a szelektív I2R

antagonista BU-224 valamint az  $\alpha_{2B/C}$  receptor antagonistista ARC239 sem befolyásolta a fenti vegyületek gátló hatását. Az antagonistáknak önmagukban nem volt hatásuk az alap kolinerg kontrakciókra (22. ábra).

Az AGN 192403 és BRL 44408 hatását a moxonidin által kiváltott kolinerg kontrakciók gátlására a 23. ábrán látható regisztrátum illusztrálja.



22. ábra. Az AGN 192403 (10  $\mu$ M), BU-224 (10  $\mu$ M), idazoxan (10  $\mu$ M), BRL 44408 (10  $\mu$ M) és ARC 239 (10  $\mu$ M) antagonisták hatása a clonidin (CLO, 1  $\mu$ M), moxonidin (MOX, 10  $\mu$ M) és rilmenidin (RIL, 10  $\mu$ M) által létrehozott gyomorkontrakciók gátlására WT C57Bl/6 egérben. Az oszlopok az átlagértékeket és a szórást ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják (üres oszlop: agonista magában, szürke oszlop: agonista + antagonisták). Zárójelben az elemszámok láthatók. \*\*\* $p < 0.001$  összehasonlítva az alapköntrakciókkal (páros Student's t-teszt).



23. ábra. Az AGN192403 (AGN, 10  $\mu$ M) és a BRL4408 (BRL, 10  $\mu$ M) hatása a moxonidin (MOX, 1nM – 10  $\mu$ M) által kiváltott kontrakciók gátlására WT C57Bl/6 egereken.

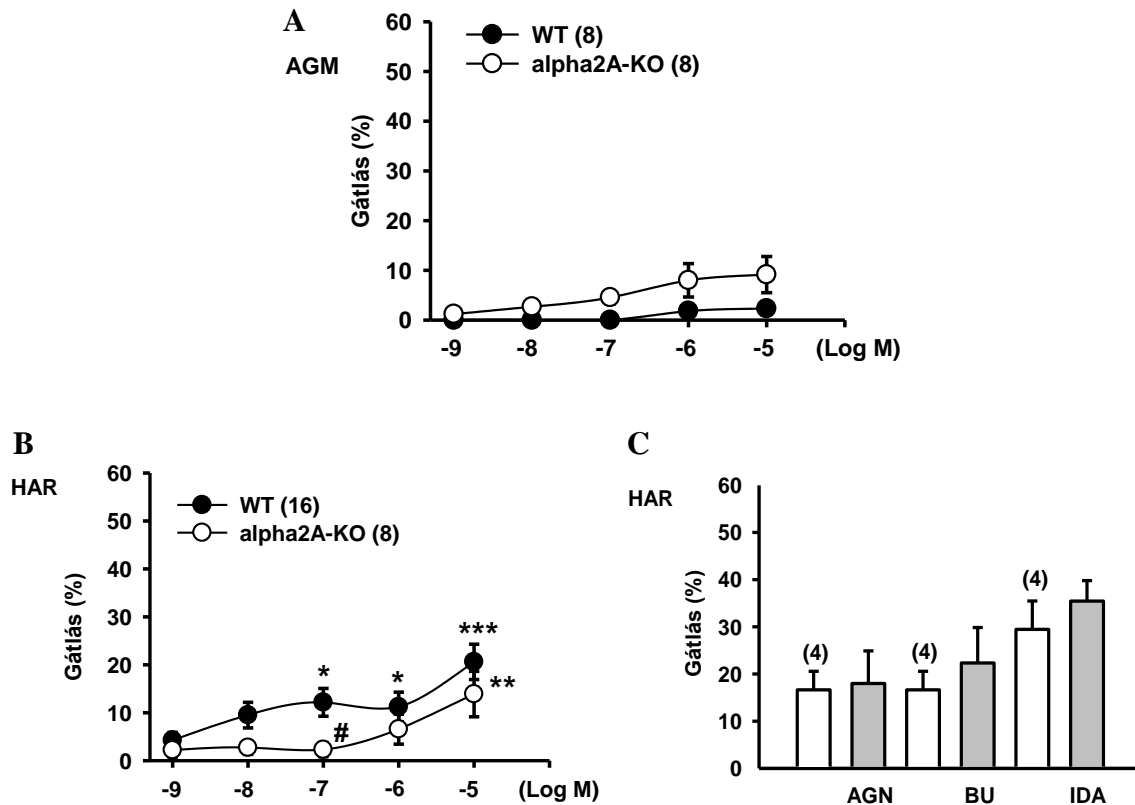
#### **4.3.3. Az endogén IR ligand agmatin és a harman hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra**

A továbbiakban az endogén IR ligand agmatin és harman szerepét vizsgáltam az EFS indukálta gyomorkontrakciók befolyásolására. Tekintettel korábbi eredményeimre (miszerint a kevert IR ligandok gyomorkontrakció gátló hatásában a három  $\alpha_2$ -AR szubtypus közül az  $\alpha_{2A}$ -AR vesz részt, ld. 4.3.1. fejezet), a két vegyület hatását  $\alpha_{2A}$ -AR KO és WT egereken vizsgáltam. A kapott eredményeim alapján az agmatinnak nem volt érdemi hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra egyik egértörzs esetében sem az alkalmazott dózisokban (24. ábra A).

Ezzel szemben a másik endogén imidazolin ligand, a harman esetében mind WT, mind  $\alpha_{2A}$ -AR KO egérnél láthatunk enyhe, de szignifikáns kontrakció gátló hatást, viszont a két egértörzsben a görbék lefutása különbözik (24. ábra B). WT állatok esetében a kontrakció gátlásnak két csúcsát figyelhetjük meg, egyrészt 100 nM-nál a gátlás átmenetileg maximalizálódik, viszont 10  $\mu$ M-nál ismét megjelenik egy csúcs a kontrakciók gátlásában. Ezzel szemben  $\alpha_{2A}$ -AR KO egerek esetében csupán 10  $\mu$ M-os koncentrációban hoz létre a vegyület szignifikáns gátlást, az alacsonyabb koncentrációkban nincs érdemi hatás. 100 nM-os koncentrációnál szignifikáns különbséget látható a két egértörzs között (WT:  $12.2 \pm 2.9$  %, n=12;  $\alpha_{2A}$ :  $2.3 \pm 1.5$  %, n=8;  $p < 0.05$ ) (24. ábra B).



A harman által kifejtett gátló hatást (legmagasabb, 10  $\mu$ M-os koncentrációban) az általunk vizsgált antagonisták közül sem az AGN 192403 (10  $\mu$ M), sem a BU-224 (10  $\mu$ M), sem az idazoxan (10  $\mu$ M) nem függesztette fel (24. ábra C) WT egérben. A vegyület oldószere nem fejtett ki hatást az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra.



24. ábra. Az agmatin (AGM, A) és a harman (HAR, B) gátló hatása az EFS-indukálta kolinerg gyomorkontrakciókra WT (fekete kör) és  $\alpha_2A$ -AR KO (üres kör) C57Bl/6 egereken. Zárójelben a kísérlet során felhasznált állatok elemszáma látható. A koncentráció-hatás görbék egyes pontjai a kontrakciók amplitúdójának átlagát és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  a szervek alapkontrakciójával összehasonlítva (kétutas ismételt mérés ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt). # $p < 0.05$  összehasonlítva a gátló hatást ugyanazon koncentrációban WT egérben (páros Student's t-teszt).

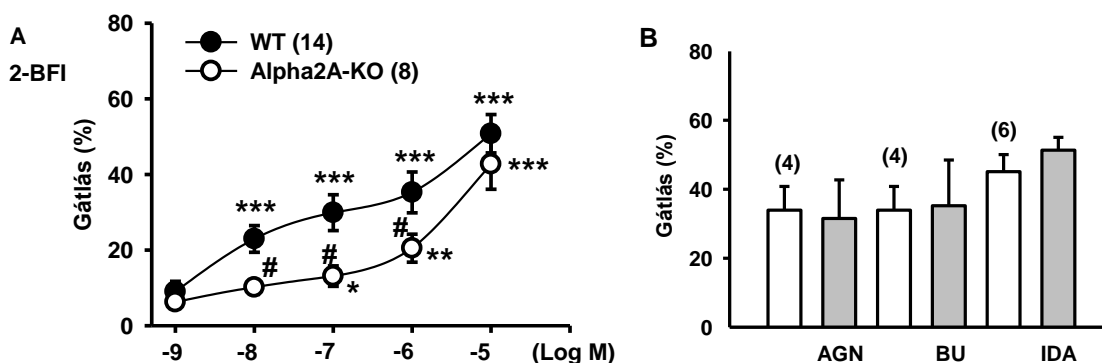
C: Az AGN192403 (AGN, 10  $\mu$ M), BU 224 (BU, 10  $\mu$ M) és idazoxan (IDA, 10  $\mu$ M) hatása a harman EFS-indukálta gyomorkontrakciók gátlására WT C57Bl/6 egéren. Az oszlopok az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják (üres oszlop: harman magában; szürke oszlop: harman + antagonista). Zárójelben a kísérlet során felhasznált állatok

elemszáma látható. Páros Student's t-tesztel analizálva az antagonisták nem hoztak létre szignifikáns változást.

#### 4.3.4. A 2-BFI hatása az EFS-indukálta gyomorkontrakciókra

Az I2R agonista 2-BFI mind WT, mind  $\alpha_{2A}$ -AR KO egérben gátolta a gyomorkontrakciókat, viszont a két görbe lefutása a harmanhoz hasonlóan különbözött. Alacsonyabb (10 nM - 1000 nM) koncentrációkban a gátló hatás szignifikánsan eltért a két törzs esetében, viszont a legmagasabb dózis alkalmazásakor (10  $\mu$ M) ez a különbség eltűnt (WT:  $50.7 \pm 5.0\%$ , n=14;  $\alpha_{2A}$ -AR KO:  $42.7 \pm 6.6\%$ , n=8; p=0.35).

Az általunk vizsgált agonisták közül (AGN 192403, BU-224, idazoxan, BRL 44408, ARC 239 /utóbbi két antagonizmus nincs ábrázolva/) egyik sem függesztette fel a 2-BFI hatását WT egérben.



26. ábra. A: 2-BFI gátló hatása az EFS-indukálta kolinerg gyomorkontrakciókra WT (fekete kör) és  $\alpha_{2A}$ -AR KO (üres kör) C57Bl/6 egerekben. Zárójelben a kísérlet során felhasznált állatok elemszáma látható. A koncentráció-hatás görbék egyes pontjai a kontrakciók amplitúdójának átlagát és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 a szervek alapkcontrakciójával összehasonlítva (kétutas ismételt mérés ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt). #p<0.05 összehasonlítva a gátló hatást ugyanazon koncentrációban WT egérben (páros Student's t-teszt)

B: Az AGN 192403 (AGN, 10  $\mu$ M), BU-224 (BU, 10  $\mu$ M) és az idazoxan (IDA, 10  $\mu$ M) hatása a 2-BFI EFS-indukálta gyomorkontrakciók gátlására WT C57Bl/6 egéren. Az oszlopok az átlagot és a szórását ( $\pm$ S.E.M.) ábrázolják (üres oszlop: 2-BFI magában;

szürke oszlop: 2-BFI + antagonista). Zárójelben a kísérlet során felhasznált állatok elemszáma látható. Páros Student's t-tesztel analizálva az antagonisták nem hoztak létre szignifikáns változást.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

### **5.1. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a gyomornyálkahártya integritásának szabályozásában**

A doktori munkám első nagy témakörében az I1/I2R-k és a gasztroprotekcio kapcsolatát vizsgáltam. Mint azt már a bevezetésben is említettem, az imidazolin hipotézis felvetése után számos kutatás indult el az imidazolin receptorok azonosítása, funkcionális szerepük bizonyítása céljából. A vizsgálatok a GI rendszerre is kiterjedtek, ahol szintén igazoltak IR-kat először radioligand kötési vizsgálattal [113-115], majd az I1R asszociált proteint, a nischarint is kimutatták patkány gyomor-bél rendszerében [118]. Emellett leírták, hogy az endogén imidazolin ligand agmatin legnagyobb szöveti koncentrációban a gyomorban, vékonybélben található [78].

A kutatások során számos publikációban elemezték az IR-k és a gasztroprotekcio kapcsolatát, esetenként ellentmondásokat is megfigyelhetünk. Az első publikációk egyikében olvashatjuk, hogy egy imidazolin szerketű vegyület (név szerint a 2-(2-methyl-4-chlorophenylamino)-2-imidazolin; [CDMI]) gasztroprotektívként viselkedett az aszpirin, illetve indometacin indukálta fekélyekkel szemben [211]. Később Glavin és mtsai írták le, hogy az I1R-iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R agonista moxonidin egyrészt a bazális savcsökkentés mellett pylorus-ligált állatokban is szignifikánsan gátolta a savtermelést, másrészt alkoholos-fekély modellben fokozta a gyomorvédelmet i.p. adagolást követően [120]. Hasonló eredményt publikáltak Carlisle és mtsai., vizsgálataik alapján a moxonidin éber patkányon i.c.v. adagolva jelentősen csökkentette a bazális sósavtermelést, illetve perifériásan (i.p.) adva növelte a gyomor mucus szintjét stressz-modell esetében. Továbbá arra a következtetésre jutottak az efroxannal végzett kísérletek értelmében, hogy mind a perifériás, mind a centrális IR-k egyaránt szerepet játszanak a gasztroprotekcio kialakulásában [158].

A fent részletezett publikációk eredményeinek ellentmond, hogy egyes imidazolin szerketű vegyületek (mint a clonidin és a tolazolin) izolált parietális sejteken fokozták a savválasztást [156]. Továbbá a kevert  $\alpha_2$ /I1R agonista clonidin i.v. adagolva fokozta a gyomorfekélyek létrejöttét patkány savas-alkoholos modellében [212]. Emellett az endogén imidazolin ligand agmatinról Glavin és mtsai írták le, hogy i.c.v. és i.p. adagolva

egyaránt növelte a sósav és a pepszin szekrécióját, csökkentette a gyomor mucus szintjét, ezáltal súlyosbította a stressz-indukálta gyomornyálkahártya-károsodásokat [121]. Utkan és mtsai dokumentálták, hogy az agmatin szisztémásan adagolva dózisfüggően fokozta az alkoholos fekélyek kialakulását és valószínűsítették, hogy az ulceratív hatásban mind az  $\alpha_2$ -AR-k, mind az imidazolin rendszer szerephez jut [122].

Ugyanakkor az agmatin gasztroprotektív hatását is leírták, i.p. adagolva szignifikánsan csökkentette a gyomornyálkahártya léziókat ischemia-reperfúziós modellen a PI3K/Akt jelátviteli útvonalon keresztül [123]. Továbbá publikált adat, hogy az agmatin képes fokozni az endogén opioidok felszabadulását [124], melyek viszont a dorzális vagus komplexen keresztül gasztroprotektívnek bizonyultak [20].

Kutatómunkám során a savelválasztástól független, alkoholos fekélymodellen vizsgáltam az IIR és I2R szerepét a centrális gasztroprotekción i.c.v. adagolás során. Ebben a modellben a savas alkohol direkt módon roncsolja a nyálkahártyát, komplex mikrovaszkuláris károsodás jön létre, mely független a savtermeléstől, ezért a defenzív faktorok szerepe, a nyálkahártya integritása jól vizsgálható [125]. Vizsgálataim során először az endogén IR ligand agmatin, majd a szelektív IIR és I2R ligandok gasztroprotektív hatását elemeztem, arra a kérdésre keresve a választ, hogy milyen módon befolyásolják a savas alkohol által indukált fekélyek keletkezését, illetve részt vesznek-e az IR-k a centrális gyomorvédelemben.

Kutatócsoportunk felvetése volt, ahogy azt a bevezetésben is említettem, hogy az IIR ligandok gasztroprotekción közvetítenek. Hipotézisünket támasztja alá egyrészt, hogy az IIR-k megtalálhatók a centrális gasztroprotekción közvetítő agyi régiókban [128], másrészt az imidazolin ligandok fokozzák a PGE2 és PGI2 termelődését, melyek alapvető fontosságúak a nyálkahártyavédelem kialakításában [126] (ld. IIR, 1.4.1. alfejezet).

Kezdeti kísérleteimet az irodalomban egyik leggyakrabban használt endogén imidazolin ligand agmatinnal kezdtem, mely i.c.v. adagolva fokozta a gasztroprotekción, viszont a dózis-hatás görbe harang alakot mutatott (2. ábra). Az agmatin esetében más kutatócsoportok is írtak le harang alakú görbét a vegyület különböző hatásának vizsgálatakor [122, 127]. A harang alakú hatás háttere nem tisztázott. Jelen esetben két dolgot feltételezhetünk, az egyik, hogy magasabb dózis alkalmazásakor a gyomorvédelem ellen játszó receptorok is aktiválódnak. Lehetséges példa az NMDA receptor, melynek aktiválódása fokozza a gyomorvédelmet [128], ezt a védő hatást

antagonizálhatja a hozzá kis affinitással kötődő agmatin a nagyobb dózisok alkalmazásakor [219]. Másik lehetőség, hogy az agmatin nagy dózisban növeli a gyomorsav termelését [121], ezáltal fokozza az alkohol direkt károsító hatását és mérsékli a gasztroprotekcíót. Végül megemlíteném, hogy jelen esetben az agmatin effektív dózisa pico/nanomoláris tartományban volt, mely korrelál patkány agyi agmatin koncentrációjával [78], ezáltal feltételezhető, hogy az agmatin élettani körülmények között is centrális gasztroprotektív vegyületként viselkedik.

Az agmatin i.p. adagolásakor viszont csupán az alacsonyabb dózisok (0.005-0.1 mg/kg) esetében figyelhetünk meg egy enyhébb gyomorvédelmet a savas alkohollal szemben (összehasonlítva a centrális adagolással), nagyobb dózisok alkalmazásakor az agmatin-indukálta védelem megszűnik. Viszont jelen esetben nem figyelhetjük meg a nagyobb dózisok alkalmazásánál az agmatin ulcerációt fokozó hatását, melyet más munkacsoportok leírtak hasonló dózisok esetében [121, 122]. Ezt a differenciát az alkalmazott metodikák különbözőségével magyarázhatjuk, hiszen a többi munkacsoport a fekélyeket vagy 50%-os alkohollal váltották ki, illetve stressz-fekélyt alkalmaztak, mely protokolloknál a nyálkahártya károsodása mérsékeltebb. Kutatócsoportunk feltételezése szerint a perifériásan adagolt agmatin hatásának hátterében szintén centrális komponens állhat, hiszen az i.p. adagolású agmatin esetében is a dózis-hatás görbe bifázisos karaktert mutat, valamint ismert tény, hogy az agmatin átjut a vér-agy gáton [220].

A továbbiakban vizsgáltam, hogy a széles receptoriális profillal rendelkező agmatin [221] hatásában szerepet játszik-e az imidazolin rendszer. Kísérleteim során az agmatin gasztroprotektív hatását a kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R antagonistá efaroxan és az  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxan teljes mértékben felfüggesztette, viszont a szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonistá yohimbin a nyálkahártyavédelmet csupán részlegesen csökkentette. Ezek alapján nagy valószínűséggel elmondható, hogy mind az  $\alpha_2$ -AR-k, mind az I1/I2R-k is részt vesznek az agmatin hatásának közvetítésében. Mivel az irodalomban a szelektív I1R ligand AGN 192403 esetében nem tisztázott, hogy a vegyület agonista, vagy antagonistá, ezért általában ligandként emlegetik, viszont egyes publikációkban ezt a vegyületet szelektív I1R antagonistaként kezelik [222], ezért vizsgáltam, hogy a vegyületnek van-e hatása az agmatin által indukált gyomorvédelemre. Kísérleteimben a szelektív I1R ligand AGN 192403 felfüggesztette az agmatin gasztroprotektív hatását.

A továbbiakban az I1R-k és az I2R-k gasztroprotektív szerepének tisztázása céljából szelektív IR ligandokat alkalmaztam. Kísérleteim során a szelektív I1R ligand AGN 192403 i.c.v. adagolva, dózisfüggően fokozta a gyomorvédelmet az általunk alkalmazott állatmodellben (4. ábra A panel). Tekintettel arra, hogy az AGN 192403 felfüggesztette az agmatin indukálta nyálkahártyavédelmet, illetve mivel önmagában adagolva is gasztroprotektíót közvetített, felvethető, hogy az AGN 192403 az I1R-n parciális agonistaként viselkedik.

Vizsgálatom következő tárgya, a szelektív I2R ligand 2-BFI esetében szintén gasztroprotektív hatást vártam. Az I2R főként úgy ismert, mint enzimfehérjéken található kötőhely, I2R-kat azonosítottak a MAO allosztérikus kötőhelyeként, továbbá az I2R aktivációja a MAO enzim gátlásához vezet [42, 43]. A MAO enzim két fő izoformájának, a MAO A-nak és a MAO B-nek a gátlásával az izoformának megfelelően a monoaminok lebontása, mint a dopamin, NA, 5-HT gátlódik. Hipotézisünk szerint I2R aktivációval gátolhatjuk a MAO B enzim működését, ezáltal csökkentjük a dopamin lebontását, mellyel fokoznánk a gyomorvédelmet. Elméletünket támasztja alá, hogy a MAO B gátló L-deprenyl (szelegilin) i.p. és i.c.v. adagolva egyaránt gátolta a stressz-indukálta gyomor léziókat patkány esetében [223]. A dopamin gasztroprotektív szerepét bizonyítja, hogy dopamin 1 és dopamin 2 receptor agonisták fokozták a gyomorvédelmet stressz-, illetve alkoholos fekélymodellel egyaránt, illetve csökkentették a savelválasztást [224]. A védelem közvetítésében perifériás faktorként a PG-k és a H2S szerepét is igazolták [224]. Cross és mtsai publikálták, hogy a dopamin prekursor L-dopa i.p. adagolva védelmet biztosított a savas alkohollal szemben, a védelmet a szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonista yohimbin részlegesen felfüggesztette [225]. Itt felmerült tehát, hogy a dopamin gasztroprotektív szerepében az  $\alpha_2$ -AR-k is szerepet kapnak. Az  $\alpha_2$ -AR-k esetében pedig jól ismert, hogy a gasztroprotektíót többek között vagus dependens módon, a CGRP és NO szintjének emelésével fejt ki [21].

Az előző bekezdésben részletezetteknek megfelelően elmondhatjuk, hogy a receptorok számos esetben szoros összefüggésben állhatnak egymással, sok esetben egy adott receptor aktivációja számtalan másik receptorra fejt ki hatást. Jelen kísérleteinkben igazoltuk, hogy az I2R agonista 2-BFI i.c.v. adagolásával jelentős centrális gasztroprotektíót tudunk kiváltani (a lézió index a kontroll csoport 30 %-a; 4. ábra B panel).

Végezetül arra a kérdésre kerestem választ, hogy az IR ligand agmatin centrális gyomorvédő hatását mely perifériás faktorok közvetítik. A kapott eredményeim alapján a NO felszabadulás, a PG szintézis egyaránt szerepet játszik a gasztroprotekciónban, a hatást pedig az efferens vagus rostok közvetítik. Ezt támasztja alá, hogy a bilaterális cervicalis vagotomia, az L-NNA-val és az indomethacinnal történt előkezelés egyaránt felfüggesztette a védelmet. A kapott eredmény nem meglepő, hiszen a bevezetésben már említettem, hogy számos neuropeptid centrális gyomorvédő hatásában részt vesznek a fenti faktorok. Nem elhanyagolható tehát, hogy mind a NO, mind a PG-k fokozzák a nyálkahártya vérátáramlását, stimulálják a mucus, bikarbonát és foszfolipid szekréciót, gyorsítja a nyálkahártya gyógyulását és felépülését [123, 226]. Továbbá említeném a szenzoros afferens rostokból felszabaduló CGRP szerepét, mely szintén fokozza a nyálkahártya mikrocirkulációját, növeli a mucus szintézist, serkenti a prosztaciklin, NO és szomatosztatin felszabadulást. A szomatosztatin, az alkohol-, illetve indometacin-indukálta fekélyek esetében korábban is gasztroprotektívnak bizonyult, szignifikánsan csökkentve a leukotrién szintet [227]. A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a savas alkohol hatására lecsökkent a szöveti szomatosztatin és CGRP szint is, azonban ez a csökkenés az agmatinnal kezelt csoportban nem volt megfigyelhető. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az agmatin a savas alkohollal szembeni gyomorvédő hatásában szerepet játszik a CGRP és a szomatosztatin is.

Habár a kapott eredményeink állatkísérleti modelleken alapulnak és az eredmények humán transzlációja még kérdéses, felvethető, hogy a ma már széleskörben vérnyomáscsökkentőként alkalmazott rilmenidin és moxonidin gasztroprotektív hatással is rendelkezik. Viszont az irodalomban jelenleg még nem áll rendelkezésre humán adat, miszerint a tartósan moxonidint, illetve rilmenidint szedő betegeknél csökkent a peptikus fekélybetegség incidenciája/prevalenciája, pedig felvetésünk alátámasztásához ezeknek a humán statisztikáknak az elvégzése nélkülözhetetlen lenne. A fent részletezett eredményeink alapján egyrészt az előbb említett vegyületeknek egy további jótékony hatása válna kiaknázzhatóvá a klinikumban (vérnyomáscsökkentő hatása mellett még gyomorvédőként is funkcionál), illetve további lehetőség nyílna a peptikus fekély terápiájában.



## **5.2. Az IIR-k és az $\alpha_2$ -AR-k szerepének vizsgálata colitisben**

### **5.2.1. Különböző kevert $\alpha_2$ -AR/IR, szelektív IIR, illetve endogén IR ligandok hatásának vizsgálata a DSS-indukálta colitis modellben**

Mint azt már korábban is részleteztem, a GI rendszerben többek között radioligand kötési vizsgálatokkal is bizonyították az IR-k jelenlétét, jelen esetben kiemelném, hogy IR-kat mutattak ki a colon epitheliális sejtjeiben [228].

Számos publikáció foglalkozik az imidazolin ligandok direkt vagy indirekt gyulladáscsökkentő hatásával. A clonidin és a rilmenidin anti-inflammatorikus hatását bizonyítja, hogy akut karragén-, szerotonin-, formalin-, és hisztamin teszteken csökkentik patkány talpödémáját, mely hatásokat feltehetően az  $\alpha_2$ -AR mediálja [198, 229]. A moxonidin túlsúlyos menopauzán átesett nők esetében csökkentette az egyik fő gyulladáscsökkentő citokin, a TNF- $\alpha$  szintjét a szérumban [171]. Emellett humán myeloma multiplexes adatok szólnak arról, hogy számos imidazolin szerkezetű vegyület képes gátolni a myelomas sejtvonalat proteoszóma gátlásával [230], illetve megakadályozzák az NF- $\kappa$ B által mediált gén transzkripciót sejt kultúrákban [231], valamint gátolják a proinflammatorikus citokinek, mint a TNF- $\alpha$  és az IL-6 termelését [232]. Továbbá fontos kiemelni Molderings és mtsai hipotézisét az imidazolin ligandokkal kapcsolatban, mely szerint az IIR az S1P receptorcsalád tagja, az S1P<sub>1-3</sub> receptorok homo- vagy heterodimerje [166]. Dokumentált adat, hogy az S1P<sub>1-3</sub> receptorok esszenciális szereppel bírnak az immunrendszer folyamataiban, az S1P receptor modulátorok csökkentik a gyulladás súlyosságát különböző modellek, így a colitis esetében is [168, 169]. Ezek alapján felvethető, hogy ha az IIR-k az S1P receptorcsalád tagjai, akkor képesek enyhíteni a gyulladás tüneteit és alkalmasak lehetnek a gyulladásos bélbetegség kezelésében is.

Ismételten hangsúlyoznám, hogy az IR ligandok nagy affinitással kötnek  $\alpha_2$ -AR-khoz is [2], ezért nem szabad figyelmen kívül hagyni az  $\alpha_2$ -AR-kat imidazolin hatás vizsgálata esetében, éppen ezért gyakran párhuzamosan írok a két receptorcsoportról. Doktori pályamunkám második nagy témakörében azokra a kérdésekre kerestem a választ, hogy az imidazolin ligandok befolyásolják-e a DSS-colitis kezdeti fázisának lefolyását, illetve hatás esetén ezt IIR-k, esetleg  $\alpha_2$ -AR-k közvetítik. Az  $\alpha_2$ -AR vonalat továbbgondolva, humán vonatkozásban korábban leírták, hogy a nem szelektív  $\alpha_2$ -AR /IR

agonista clonidin javítja IBD-ben szenvedő betegek tüneteit [170, 233]. Viszont egyes újabb publikációk szerint az  $\alpha_2$ -AR aktiváció fokozza a proinflammatorikus citokinek és kemokinek felszabadulását az immunsejtekből, ezáltal súlyosbítja a kórkép tüneteit [234, 235]. Kísérleteim jelentős része is azt sugallja, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k aktivációja fokozza a proinflammatorikus citokinek felszabadulását, ezáltal súlyosbítja a gyulladás mértékét (ld. eredmények 4.2.5. fejezet, illetve részletesen később). Az  $\alpha_2$ -AR-k gyulladást kiváltó hatását támasztja alá az a megfigyelés, hogy  $\alpha_2$ -AR aktiváció hatására csökken a kolinerg végkészülékekből az ACh felszabadulása, amely viszont a makrofágok nikotinos acetilkolin receptorán keresztül gyulladáscsökkentő hatással bír [236].

Mint korábban említettem, kísérleteim során kémiai úton indukált colitis modellen vizsgáltam az imidazolin ligandok szerepét a colitis kezdeti fázisára. Az állatok bélgyulladását DSS-oldat itatásával váltottam ki, amely egyike az irodalomban leggyakrabban használt colitis modelleknek. Tekintettel arra, hogy kutatásom során valószínűsítettem, hogy az imidazolin ligandok inkább védő hatást fejthetnek ki a colitis lefolyására, ezért a célom közepesen súlyos - súlyos colitis indukálása volt, de még alacsony halálozással. Ezt 2.5%-os DSS-oldat 7 napos adásával értem el, a kísérlet a 9. napon fejeződött be.

Ezen protokoll segítségével a DSS erőteljes hasmenést, GI vérzést és fogyást indukált, következményes colon rövidüléssel, valamint emelkedett MPO és IL-6 szinttel a colonban, illetve a szérumban egyaránt. A kísérletek során vizsgált imidazolin ligandok alkalmazott dózisaik egyrészt korábbi irodalmi adatokon nyugszanak, másrészt klinikailag is relevánsak (a rilmenidin és a moxonidin esetében 0.01-1 mg/kg vizsgált dózistartomány megközelíti egy 70 kg-os ember gyógyszeres kezelésénél alkalmazott 0.06-5.6 mg dózistartományt [237]).

Az általam vizsgált kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R, illetve szelektív I1R és endogén IR ligandok jelen kísérleti protokollban nem befolyásolták sem a colitis makroszkópos, sem a szövettani képét, továbbá nem volt hatásuk a colon MPO, valamint a szérumban IL-6 szintjére sem.

Felmerülhet kérdésként, hogy az endogén imidazolin ligand agmatin, mely számos receptoriális profillal rendelkezik, miért nem befolyásolta a DSS-colitis lefolyását. Az agmatin a gyomorfekélyes kísérleteinkben gasztroprotektívnak bizonyult, hatásának a közvetítésében az imidazolin rendszer is szerepet játszik. A DSS-colitis

esetében felmerül, hogy az agmatin, mely kötődik  $\alpha_2$ -AR-khoz is, súlyosbíthatná a colitis lefolyását. Mivel ezt a súlyosbító hatást nem látjuk, felvethetjük, hogy a számos receptorhoz kötődő agmatin esetében a vegyület pro-, illetve anti-inflammatorikus hatása kiegyenlítődik. Ismert tény, hogy az agmatin citoprotektív vegyület, csökkenti az oxidatív stresszt, a szabadgyökök képződését, továbbá NOS gátló [86, 87]. A citoprotektív hatásra példa, hogy az agmatin védelmet tud nyújtani a doxorubicin okozta krónikus cardiotoxicitás ellen is [238]. Tehát az agmatin esetében felvetődik, hogy a hatások kiegyenlítése miatt nem figyelhetjük meg a DSS-colitis befolyásolását.

A kísérletek során felmerült a kérdés, hogy a moxonidin 2, valamint a rilmenidin 8 órás felezési ideje [239] miatt a napi egyszeri adagolás nem ér el elégséges plazmaszintet a megfelelő pro/anti-inflammatorikus hatás eléréséhez. Habár ennek ellent mond, hogy mind a moxonidin, mind a rilmenidin vérnyomáscsökkentő hatástartama – a rövid féléletidő ellenére - 12-24 órán keresztül tart [239]. Kísérleteimben a rilmenidin, az AGN 192403 és az efaroxan napi kétszeri alkalmazása sem befolyásolta a DSS-colitis tüneteit. A moxonidin (0.1 mg/kg) esetében nem volt változás a DAI-ban, illetve a colon rövidülésben, viszont a vegyület szignifikáns súlycsökkenést eredményezett a DSS-kontroll csoporthoz hasonlítva. Mivel az állatok étel-és vízfogyasztása között nem volt érdemi különbség a moxonidinnal kezelt és a DSS-kontroll csoport között, felmerül annak a lehetősége, hogy a moxonidin valójában enyhén súlyosbította a colitis tüneteit. Tekintettel arra, hogy a moxonidin és a rilmenidin körülbelül hasonló affinitással kötődik az  $\alpha_2$ -AR-khoz [2, 240, 241], viszont a moxonidin nagyobb hatáserősségű [200], lehetséges, hogy a moxonidin 0.1 mg/kg-os dózisának napi kétszeri adagolása (mely körülbelül a maximális humán napi dózis kétszeresének felel meg [241; 242]) már olyan szintű  $\alpha_2$ -AR aktivációval jár, mely a colitis lefolyását enyhén súlyosbítja. Ezért további kísérleteket végeztem, melyekben az  $\alpha_2$ -AR-k szerepét szerettem volna igazolni a DSS-indukálta colitis patológiájában (ld. 4.2.5. alfejezet, illetve a következő alfejezetet).

Hangsúlyoznám, hogy az IBD-nek több, mint 60 colitis modellje létezik, mely számos vonatkozásban, pl. patomechanizmusban, makroszkópos/szövettani képen, valamint citokin profilban is különbözik. Előfordulhat, hogy egy vizsgált vegyület hatékony az egyik modellben, viszont hatástalan egy másikban, a háttérben a vegyületek eltérő hatásmechanizmusa, illetve a modellek különbözősége áll. Habár a DSS-indukálta colitis modell az egyik leggyakrabban alkalmazott IBD modell a gyulladás könnyű

kiválthatósága és reprodukálhatósága miatt, továbbá az általa kapott eredmények egyes publikációk alapján transzlálhatók a klinikai gyakorlatba [243], fontos megjegyezni, hogy több olyan gyulladáscsökkentő, melyek a klinikumban bizonyítottan hatásos IBD-s betegekben (pl. olsalazin, budesonid), DSS modell esetén nagyon változó hatást mutatnak. Ez a hatás számos faktortól (pl. a DSS-oldat koncentrációja, az expozíció időtartama, az állatok genetikai állománya, stb.) függ [194, 244]. Bár a kapott eredményeink alapján felvethető, hogy a klinikumban antihipertenzívumként alkalmazott imidazolin ligandok nem befolyásolják lényegesen az IBD-k kórlefolyását, ennek bizonyítására további kísérletek szükségesek többek között egyéb colitis modelleken, illetve a humán eredmények ismerete is nélkülözhetetlen.

### **5.2.2. Az $\alpha_2$ -AR-ok szerepének tisztázása a colitis patomechanizmusában**

Tekintettel arra, hogy az imidazolin ligandok nagy affinitással kötődnek az  $\alpha_2$ -AR-khoz [2], nem zárható ki, hogy az imidazolin ligandok hatását részben/egészben az  $\alpha_2$ -AR-k mediálják. Az előző fejezetben részletezett eredmények alapján az imidazolin ligandok nem befolyásolják lényegesen a DSS-indukálta colitis lefolyását. A napi 2x-i adagolású moxonidin (0.1 mg/kg) esetében láttuk, hogy a vegyület súlyosbította a súlycsökkenést a DSS oldatot fogyasztó, fizioológias sóoldattal kezelt csoporthoz viszonyítva. Annak igazolására, hogy ezen hatás a bélgyulladás enyhe súlyosbításának következménye és  $\alpha_2$ -AR-ok által mediált, további vizsgálatokat végeztem különböző  $\alpha_2$ -AR szubtípus KO egerek, majd a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL 44408 felhasználásával.

Az  $\alpha_2$ -AR-k GI rendszerben betöltött szerepe széleskörűen dokumentált. Pre-, illetve posztzinaptikus receptorként az enterális neuronokon, enterocytákon és a simaizomsejteken is megtalálhatók. Többek között szerepet játszanak a bélrendszer neurotranszmissziójában, az elektrolit transzport és a visceralis érzékelés szabályozásában, a motilitásban [14]. Emellett az  $\alpha_2$ -AR agonisták centrális gasztroprotekcíót váltanak ki [245].

Az  $\alpha_2$ -AR-k aktivációja és az IBD közötti összefüggés már pár évtizeddel ezelőtt felmerült, viszont a különböző publikációk során kapott eredmények meglehetősen ellentmondásosak. 1985-ben Lechin és mtsai figyelték meg, hogy a clonidin krónikus

alkalmazása javította a colitis ulcerosa endoszkópos és a szövettani képét [170, 233]. Továbbá a szelektív  $\alpha_2$ -AR agonista dexmedetomidine csökkentette a TNBS-indukálta colitis gyulladásos tüneteit [246]. Ezen eredmények alapján az  $\alpha_2$ -AR-ok stimulációja gyulladáscsökkentő hatású. Ennek azonban ellentmond az a megfigyelés, mely szerint a makrofágokon és neutrofil granulocytákon is megtalálható  $\alpha_2$ -AR-k fokozzák azokból a proinflammatorikus citokinek felszabadulását [27, 247], és az  $\alpha_2$ -AR agonisták ezáltal súlyosbítják a tüdők gyulladásos károsodását egérben és patkányban egyaránt [247].

Összességében elmondhatjuk, hogy az  $\alpha_2$ -AR agonistákkal végzett állatkísérletek, preklinikai és klinikai vizsgálatok egyaránt leírták a colitis tüneteinek súlyosbodását, illetve javulását, a kapott eredmények különbözősége nem teljesen tisztázott. Állatkísérletek esetében előfordul, hogy a kapott eredmények részben azért ellentmondásosak, mert az  $\alpha_2$ -AR agonistákat különböző colitis modelleken alkalmazták (DSS-, TNBS-, DNBS-colitis), mely modellek különböznek egyrészt a patomechanizmusban, a makroszkópos/mikroszkópos képben, másrészt a citokinprofilban is [248, 249]. Ezek alapján előfordulhat, hogy egy vegyület képes befolyásolni a gyulladás mértékét az egyik modellben, viszont ugyanaz a vegyület nem fejt ki hatást egy másik modell alkalmazása esetén [250]. Viszont az  $\alpha_2$ -AR-k szerepének megértését a colitis lefolyására tovább nehezíti, hogy esetenként eltérő eredményeket publikáltak ugyanazon colitis modell (TNBS) alkalmazása esetén is [235, 246].

Jelen esetben az  $\alpha_2$ -AR iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert  $\alpha_2$ -AR/ $\alpha_1$  agonista clonidin hatását vizsgáltam a bél gyulladásos folyamataira, amit szintén DSS-oldat adásával váltottam ki. Tekintettel arra, hogy az  $\alpha_2$ -AR-knak 3 altípusa ismert, amelyek mind bírnak GI hatással [17, 245, 251], valamint a fagocitákon mind a 3 szubtípus expresszálódik [247], célom volt (hatás esetén) a hatást közvetítő szubtípus azonosítása.

A korábban leírtaknak megfelelően, illetve a moxonidin esetében kapott eredmények alapján a kutatócsoportunk felvetette, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k súlyosbítják a gyulladást, ezért kevésbé súlyos colitis létrehozását tartottam optimálisnak. Jelen protokollban 2%-os DSS-oldatot alkalmaztam 7 napig, ezzel enyhébb colitist hoztam létre, melyet az MPO szint mérsékeltebb emelkedése is alátámasztott. A kapott eredményeim alapján a clonidin enyhén súlyosbította a colitis tüneteit, korábban emelkedett a DAI index a DSS-kontroll csoporthoz képest, viszont a gyulladásos

paraméterekben a kísérlet végére a különbség eltűnt. A clonidin legszembetűnőbb hatása az erőteljes testsúlycsökkenés kiváltása volt. Felvethető, hogy ennek hátterében a centrális  $\alpha_2$ -AR-k az állatok étel-/vízfogyasztását direkt módon befolyásoló hatása áll [252, 253]. Korábbi publikációk eredménye szól arról, hogy a kevert  $\alpha_2$ -AR/11R agonista clonidin csökkenti a folyadékfelvételt centrális  $\alpha_2$ -AR-k aktiválásán keresztül, mely hatás kiváltásában a lateralis hypothalamusz, illetve a preoptikus area is szerepet játszik [254, 255]. A moxonidin esetében is leírták a folyadékfelvétel gátlását, a hatás mediálásában itt is a centrális  $\alpha_2$ -AR-k voltak a felelősek [256]. Hasonló eredményt írtak le Andrade és mtsai., vagyis a moxonidin csökkentette a folyadékfogyasztást az előagy  $\alpha_2$ -AR-ai aktiválásával [60]. A moxonidin anorexigén hatása a hypothalamusz NPY szintjének csökkentése által valósul meg. Emellett a moxonidinnel kezelt állatok esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a plazma inzulin és leptin szintje, amely ugyancsak szerepet játszhat a táplálékfelvétel csökkenésében [257].

Továbbá felmerül, hogy a súlycsökkenésben szerepet játszhat az  $\alpha_{2A}$ -AR közvetített szedáció [258], ami esetleg közvetett módon befolyásolhatná az állatok táplálékfelvételét.

Kísérleteimben azonban a clonidin nem befolyásolta számottevően az állatok étel-/vízfogyasztását, és csupán rövid ideig tartott a szedatív hatása. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a clonidin által kiváltott szignifikáns súlyvesztés a bélgyulladás súlyosbításának és az állatok általános állapotromlásának a következménye és nem pedig egyéb hatások eredménye. Emellett szól az is, hogy a clonidin a csapvizet fogyasztó csoportban sem váltott ki szignifikáns testsúlycsökkenést

Utalva korábbi eredményeimre, miszerint az 1R-knak nincs érdemi szerepe a DSS colitisre, feltételezhető, hogy a hatást az  $\alpha_2$ -AR-k mediálják. A továbbiakban vizsgáltam, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k 3 szubtípusa közül melyik lehet felelős a clonidin hatásáért. A kapott eredményeim alapján elmondható, hogy az  $\alpha_{2A}$ -AR felelős a clonidin colitist súlyosbító tüneteire, mivel  $\alpha_{2A}$ -AR KO egér esetében a clonidin hatása csökken, viszont  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR KO egernél a colitis lefolyásában hasonló eredményt láthattunk, mint a vad típusú egereknél. Az  $\alpha_{2A}$ -AR szerepét bizonyítja továbbá, hogy a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL 44408 késleltette a colitis kifejlődését, csökkentette a súlycsökkenést és a colon MPO szintjét, mely a csapvizet fogyasztó állatokéhoz hasonló értéket mutatott.

Ezt követően a BRL 44408 anti-inflammatorikus hatását elemeztem a citokinek és kemokinek szintjén. A BRL 44408 gátolta a DSS-által kiváltott CXCL13 (*B lymphocyte chemoattractant*) emelkedését, mely citokin interakcióba lép a CXCR5 kemokinreceptorral és ez a kölcsönhatás a felelős az általuk mediált hatások döntő többségéért. Fő szerepük, hogy organizálják a B-sejteket a nyirokcsomókban és a lymphoid szövetekben, továbbá szabályozzák a T és a B lymphocyták szegregációját, másrészt a CXCR5+ T sejtek antigénre adott B sejt válaszát [259]. Továbbá a BRL 44408 csökkentette a kemoattraktáns CCL3 (*macrophage inflammatory protein 1-alpha*) szintjét, mely citokin az akut gyulladásos állapotokban játszik szerepet a polimorfonukleáris leukociták felhalmozásában és aktiválásában [260]. Ezen felül a BRL 44408 mérsékelte a CXCL2 (*macrophage inflammatory protein 2-alpha*) citokin szintjét is, mely kemotaktikus a polimorfonukleáris leukocitákra és a hemopoetikus őssejtekre nézve [261]. Mindemellett a szelektív  $\alpha_2A$ -AR antagonistá enyhítette a G-CSF emelkedését, ennek véleményem szerint indirekt oka van, vagyis a BRL 44408 hatására a colitis súlyossága csökkent, ezáltal csökkent a vérveszteség, így mérséklődött a hematopoiesis üteme is. Habár a fenti citokinek többségében (kivétel a CXCL13) csupán enyhe változást észlelhetünk, de mivel a CCL3, a CXCL2 és a G-CSF egyaránt képes fokozni a neutrofil granulociták beáramlását, valószínűsíthető, hogy a gyenge hatások együttesen már jelentősebb gyulladáscsökkentést tudnak létrehozni. Ezt támasztja alá, hogy a BRL 44408 hatására lecsökkent a neutrofil granulocita beáramlás egyik markere, az MPO szint. Összességében elmondható, hogy a citokinek szintjén is tudtuk igazolni az  $\alpha_2A$ -AR gátlásával az antiinflammatorikus hatást.

Kísérleteink során azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy a DSS oldat indukálta TIMP1 emelkedés tovább növekedett a BRL 44408 hatására. A mátrix metalloproteinázok (MMP) fő résztvevői az extracelluláris mátrix komponensek lebontásának mind élettani, mind kórélettani körülmények között (beleértve a colitist is) [262]. Habár az MMP-k aktivitását a gyulladásos folyamatokban szintén a megemelkedett TIMP szabályozza, valószínűsítik, hogy a megemelkedett MMP aktivitás és a következményes egyensúly felbomlása az MMP és a TIMP között a gyulladásos folyamatok esetén kiemelten fontos szerepet játszik [263, 264]. Továbbá elképzelhető, hogy a BRL 44408 által megnövekedett TIMP-1 aktivitás az egyensúlyt a TIMP javára mozdítja el, ezáltal javítva a gyógyulási folyamatot és csökkentve a szöveti károsodást.

Hasonló TIMP-1 mediálta védelmet írtak le infliximab kezelés esetén Crohn betegségben [265].

Összefoglalásként elmondható, hogy eredményeim alapján az  $\alpha_2$ -AR-k farmakológiai aktivációja enyhén súlyosbítja a DSS-colitis lefolyását, míg ezen receptorok gátlása erőteljes anti-inflammatorikus hatással bír. Az, hogy a pro- és antiinflammatorikus hatások mértéke eltérő, arra utal, hogy a colitis kialakulásának kezdeti fázisában az  $\alpha_2$ -AR-ok már eleve fokozott aktivitást mutatnak. Ennek több oka is lehet, például a fokozott szimpatikus tónus megnövekedett katekolamin felszabadulással [233], illetve a fokozott katekolamin felszabadulás a lokális immunsejtekből [234]. Az  $\alpha_2$ -AR-k által közvetített proinflammatorikus hatás hátterében is több tényező állhat. Kimutatták például, hogy colitis során az  $\alpha_2$ -AR-k neuronális expressziója fokozódik az enterális idegrendszerben [266], ezáltal erőteljesebb a kolinerg neuronokon kifejtett preszinaptikus gátló hatás. Az ACh csökkent felszabadulása ugyanakkor proinflammatorikus hatású, ugyanis kevésbé képesek aktiválódni a makrofágokon gyulladáscsökkentő hatással bíró  $\alpha_7$  nikotinos ACh receptorok [236]. Emellett, amint azt korábban is kifejtettem, az  $\alpha_2$ -AR-k közvetlenül képesek fokozni számos citokin és kemokin felszabadulását az immunsejtekből, ilyen a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, a citokin-indukálta kemoattraktáns 1 [27, 234, 247, 267], valamint a kapott eredményeink alapján befolyásolják a CCL3, CXCL2, CXCL13 és a G-CSF szintjét.

Végezetül a DSS-oldattal végzett kísérleteim összegzéseként elmondható, hogy az imidazolin receptorok lényegében nem befolyásolják az akut DSS-colitis lefolyását, a moxonidin esetében észlelt enyhe súlyosbító hatást nagy valószínűséggel az  $\alpha_2$ -AR-k közvetítik. Az  $\alpha_2$ -AR KO egerekkel és a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistával végzett kísérleteim alapján az  $\alpha_{2A}$ -AR az akut colitis lefolyását súlyosbította az általam alkalmazott protokollban. Viszont csupán egy colitis modellt alkalmaztam kísérleteim során, további kutatások szükségesek, hogy az általam kapott eredmények ténylegesen bizonyító erejűvé váljanak. Habár a kapott adatok nem elégségesek a humán transzlációra, felvethető, hogy a vérnyomáscsökkentőként alkalmazott, az IIR iránt nagyobb szelektivitással bíró kevert imidazolin ligandok nem befolyásolják érdemben a gyulladásos bélbetegségek lefolyását. Ugyanakkor nem elhanyagolható, hogy a vizsgált kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR ligandok képesek  $\alpha_2$ -AR-hoz is kötődni, így nagyobb dózisok alkalmazásakor már  $\alpha_2$ -AR mediálta hatásokkal is számolni kell, ezért IBD-ben való



adásuk óvatosságra int, de természetesen humán vizsgálatokra van szükség ennek alátámasztására.

Továbbiakban igazoltam, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k aktivációja, az  $\alpha_2$ -AR agonisták enyhén súlyosbíthatják a colitis tüneteit, mely valószínűleg klinikailag nem számottevő az  $\alpha_2$ -AR-knak a colitis kezdetén megfigyelhető fokozott aktivitása miatt. Viszont felvethető, hogy az intenzív terápiában alkalmazott clonidin, illetve dexmedetomidin az  $\alpha_{2A}$ -AR-n keresztül súlyosbíthatja a gyulladásos bélbetegség tüneteit, így akár az alapbetegség fellángolása következtében szükséges sebészi beavatkozás és intenzív terápia alkalmazása esetén az  $\alpha_2$ -AR agonisták alkalmazása kontraindikált lehet. Emellett eredményeink alapján az  $\alpha_2$ -AR antagonisták kifejezetten anti-inflammatorikus hatással bírnak, ezáltal alkalmazásuk új terápiás lehetőséget rejtenek az IBD-k gyógyításában.

### **5.3. Az I1R-k és az I2R-k szerepének elemzése a fundus kontraktilitásának szabályozásában**

A gyomor motilitás zavarai a GI megbetegedések egy jelentős részét képezik. A normális gyomorműködés magába foglalja a gyomor akkomodációját (táplálékfelvétel biztosítása) és a megfelelő mértékű gyomorürülést (mely eleget tesz a vékonybél abszorpciós képességének, továbbá az emészthetetlen részek eltávolításának). Károsodott motilitás esetén felbomlik az egyensúly a gyomorürülés, a rezervoár funkció, valamint a teljes bélrendszer motoros működésének harmóniája között [268]. A károsodott gyomor akkomodáció a rezervoár funkció zavarához vezet, következményes korai jóllakottságérzettel és fogyással [268, 269]. Ahogy a bevezetésben is említettem, a DGBI egyik fő csoportja a FD, a FD-ban szenvedő betegek 30%-ban csökkent a gyomorürülés [174], illetve megfigyelhető az akkomodációs képesség zavara. Az akkomodáció javítására egyik lehetőség a gyomorfundus relaxációjának előidézése, melyet két farmakológiai útvonalon keresztül tudunk végrehajtani [174]. A fundus relaxációját elérhetjük egyrészt a NO tartalmú nitrilerg rostok aktivációjával, esetleg NO donor vegyületek alkalmazásával [174, 185], másik lehetőség a motilitászavar kezelésére a főleg kolinerg excitatorikus motoros neuronok gátlása, amit a preszinaptikus gátló receptorok aktivációjával is [174] kiválthatunk.

Kutatásom harmadik nagy témakörében az I1R-k és az I2R-k szerepét vizsgáltam az elektromos téringerléssel indukált kontrakciók gátlására izolált egérfundus esetében. Korábbi vizsgálatokban a clonidin esetében leírták, hogy képes javulást létrehozni a gyomor akkomodációs zavaraiiban [186]. Az  $\alpha_2$ -AR-k iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert  $\alpha_2$ -AR/IR ligand clonidin esetében viszont számos  $\alpha_2$ -AR mediált mellékhatás megjelenésével kell számolni (szedáció, hipotonia, szájszárazság). Továbbá ismert, hogy a clonidin kötődik az IR-khoz is, ezért célunk volt annak tisztázása, hogy az IR ligandok befolyásolják-e a fundus kolinerg kontrakcióit. Dokumentált adat, hogy léteznek preszinaptikus IR-k is, melyek gátolják a neurotranszmitterek felszabadulását, mint pl. humán pitvarral végzett kutatásokban a preszinaptikus IR-k gátolták a NA felszabadulását [187]. Felvetésünk szerint, mivel a preszinaptikus IR-k gátolják a transzmitterek felszabadulását, ezáltal gátolhatják a kolinerg kontrakciókat is, így javíthatják a gyomor akkomodációját.

A preszinaptikus gátlás mellett az IR-k befolyásolhatják a gyomor motoros aktivitását egyéb útvonalakon keresztül is. Mint már a bevezetőben is említettem, az I1R képes fokozni a PG-k szintézisét [33], melyek fokozzák a simaizmok motoros működését. A PG analóg misoprostol esetében jól ismert a GI simaizmok összehúzása miatti hasi fájdalom, hasmenés megjelenése, ami pl. korlátozza a fekélyek elleni alkalmazását [270]. Ezek alapján az I1R ligandok a PG-k képzésével is fokozhatják a gyomor ürülését, jelen esetben az antrum kontraktilitásának fokozásáról lenne szó, (nem pedig a fundus kolinerg kontrakcióinak gátlásáról), mely szintén fennáll FD esetén [174, 271]. Viszont jelen kísérleteinkkel csak a fundus kontrakcióira koncentráltunk, az antrum hipomotilitásának javítására vonatkozó felvetésünk alátámasztásához további kísérletek, más állatmodellek alkalmazása szükséges.

Az I2R-k esetében Kaliszan és mtsai írtak le posztszinaptikus elhelyezkedésű, relaxáló I2R-kat, habár ez a megfigyelés ellent mond az irodalmi adatok többségének [272]. Ezek alapján további célom volt az I2R-k szerepének tisztázása a fundus kolinerg kontrakcióira.

Jelen kísérleti metodikámban az ingerlési paramétereket úgy választottam meg, hogy a gyomor-bél rendszerben már régóta bizonyított és jelentős szereppel bíró kolinerg végkészülékeket aktiváljam, ACh felszabadulást váltsak ki [16]. Az alkalmazott kísérleti

módszerrel főleg a preszinaptikus receptorok szerepe vizsgálható a kontrakciók szabályozásában.

A kutatások során számos csoport vizsgálta az imidazolin ligandok GI motilitásban betöltött szerepét, viszont a dokumentált eredmények ellentmondóak. Az első, endogén imidazolin ligandként leírt CDS esetében megfigyelték, hogy dózisfüggően fokozta patkány fundusának kontraktilitását [189]. Diabeteses gastroparesises betegek esetében a moxonidin javította a gyomorürülést [273], mely eredmény szemben állt azzal, hogy az  $\alpha_2$ -AR agonisták gátolják a gyomor motoros aktivitását [18, 274], ezért itt felmerült, hogy a hatás közvetítésében részt vehetnek az IR-k. Jelen kísérleteimben különböző kevert  $\alpha_2$ -AR/IR ligandok, illetve szelektív IR ligandok hatásait vizsgáltam vad típusú és  $\alpha_2$ -AR szubtípus KO egereken.

Kísérleteim során az  $\alpha_2$ -AR-hoz nagyobb affinitással kötődő kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR agonista clonidin dózis-hatás görbáját hasonlítottam össze az IIR iránt szelektívebb kevert imidazolin ligand moxonidinnel és rilmenidinnel [2]. A kapott eredményeim alapján mind a három vegyület dózisfüggően gátolta WT,  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR KO egér esetében az izolált gyomorkontrakciókat, míg a gátló hatás jelentősen lecsökkent (moxonidin és clonidin), vagy eltűnt (rilmenidin)  $\alpha_{2A}$ -AR KO egereknél. Mindez arra enged következtetni, hogy a moxonidin és a rilmenidin, akárcsak a clonidin is elsősorban  $\alpha_{2A}$ -AR-n keresztül fejtik ki a gyomor motilitást gátló hatásukat. A kapott eredményeimet támasztja alá, hogy Colucci és mtsai [119] is kizárták farmakológiai vizsgálatokkal a preszinaptikus IR-k szerepét tengerimalac ileum kontrakcióiban, az eredményüket később más munkacsoport is alátámasztotta [275].

Publikált irodalmi adat, hogy az  $\alpha_2$ -AR-k közül az  $\alpha_{2A}$ -AR szubtípusnak a legszélesebb a GI rendszerbeli előfordulása, ennek megfelelően ez a szubtípus a felelős a legtöbb GI hatás mediálásáért, mint pl. a motilitás [18] és a savszekréció gátlásáért [17]. Az  $\alpha_2$ -AR-kat azonosítottak a kolinerg neuronokon is, melyek részt vesznek egyrészt a circuláris izomkontrakciók szabályozásában, másrészt az elektromosan stimulált longitudinális izompreparátum kontrakcióját is gátolják kolinerg-függő módon [251]. Ezek mellett érdekességgént említeném meg, hogy nem csupán perifériás, hanem centrális  $\alpha_2$ -AR-k is csökkentik a gyomor fundusának tónusát [276], a DMNV fundusba érkező rostjai NA felszabadulást váltanak ki, melyek az  $\alpha_2$ -AR-k aktiválásán keresztül gátolják a kolinerg kontrakciókat [276].

Habár kísérleteim során a legmagasabb alkalmazott koncentrációban (10  $\mu$ M) a moxonidin és a clonidin esetében is megfigyelhettünk egy gyenge kontrakciógátlást az  $\alpha_{2A}$ -AR KO egereknél, ebben a koncentrációban felmerül a hatás közvetítésében egyéb receptorok szerepe. Ezek lehetnek akár neurotranszmitter felszabadulást gátló preszinaptikus  $\alpha_{2B}/\alpha_{2C}$ -AR-k [277], vagy nonadrenerg receptorok egyaránt. A különböző  $\alpha_2$ -AR és IR antagonistákat tesztelve elmondható, hogy csupán a szelektív  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL 44408 és a kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxan volt képes felfüggeszteni a korábban említett három vegyület hatását, míg a szelektív I1R ligand AGN 192403 [222], a szelektív I2R ligand BU-224 [278], és a szelektív  $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC 239 sem befolyásolta a vizsgált vegyületek hatását.

A továbbiakban az endogén IR ligand agmatin és harman hatását vizsgáltam a kolinerg gyomorkontrakciókra. Mint már korábban említettem az agmatin nagy affinitással kötődik az I1R-hoz, kisebb affinitással az I2R-hoz és az  $\alpha_2$ -AR-khoz, viszont emellett számos egyéb receptorhoz is képes kötődni (pl. NMDA, nikotinos acetyl-kolin receptor, 5-HT<sub>3</sub> receptor,  $\alpha_2$ -AR) [84, 279]. Tekintettel arra, hogy az agmatin legnagyobb szöveti koncentrációja a GI rendszerben (gyomorban) található [78], számos kutatás indult el a betöltött funkcionális szerepének azonosítására. Hatásai egy részét már korábbi fejezeteimben ismertettem, jelenleg itt kiemelném, hogy morfin-függő tengerimalacokon gátolta a naloxon-indukálta ileum kontrakciókat, melyet a szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonistá yohimbin csupán részlegesen, viszont a kevert  $\alpha_2$ -AR/IR antagonistá idazoxan teljesen felfüggesztett, mely alapján a hatás közvetítésében felmerült az IR-k szerepe [280]. Habár az agmatin számos GI folyamat mediálásában vesz részt, kísérleteimben nem befolyásolta a gyomor motilitását a vizsgált koncentrációkban (1nM - 10 $\mu$ M). Hasonló eredményt kaptak Liu és mtsai az ileum kontrakciók [275] esetén.

A  $\beta$ -carbolinok közé tartozó harman, mely mind a három imidazolin receptorhoz kötődő endogén imidazolin ligand, szintén számos egyéb receptor aktivitását is befolyásolja. Ennek megfelelően számos publikáció foglalkozik az általa közvetített hatásokkal, leírták az anxiolitikus és antidepresszáns [109], a hypothermiát [95] és hypotoniát [107] kiváltó hatását, viszont az irodalomban nincs adat GI hatásáról.

Kapott eredményeim alapján elmondható, hogy a harman mind WT, mind  $\alpha_{2A}$ -AR KO egér esetében gyengén, de gátolta az EFS-indukálta gyomorkontrakciókat. Tekintettel arra, hogy a legmagasabb koncentrációban (10  $\mu$ M) a gátló hatás a két

egértörzsben ugyanakkora volt, felmerült, hogy a hatás kiváltásában az IR-k szerepet kapnak. Viszont sem a szelektív IIR ligand AGN192403, sem a szelektív I2R ligand BU-224, sem a kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxan nem befolyásolta érdemlegesen a harman kontrakciógátlását. A kapott eredmények alapján lehetséges, hogy egyéb receptorok állhatnak a harman hatásának hátterében, melyeket jelen kísérleteinkben nem azonosítottunk. Kérdéses azonban, hogy a harman motilitásgátló hatásának van-e élettani szerepe, valamint a szöveti koncentrációja (melyet legjobb tudomásunk szerint eddig nem határoztak meg) elegendő-e az általunk megfigyelt (farmakológiai) hatás kiváltásához.

A továbbiakban a szelektív I2R agonista 2-BFI hatását vizsgáltam [281] izolált egérfundus motilitására. Kaliszan és mtsai [272] eredményeiben a 2-BFI dózisfüggő relaxációt indukált izolált patkány jejunum esetében, melynek közvetítését posztzinaptikus I2R-hoz kötötték. Ennek ellentmond viszont, hogy kísérleteinkben a kevert  $\alpha_2$ -AR/I2R antagonistá idazoxan ezt a hatást nem függesztette fel. Jelen kísérleteimben a 2-BFI dózisfüggően gátolta a kontrakciókat WT és  $\alpha_2$ -AR KO egerekben egyaránt, a gátló hatást pedig sem a BU-224, sem az idazoxan nem függesztette fel. Ezek alapján arra a következtetésre jutunk, hogy a hatás létrejöttében nem vesznek részt az IR-k. A kapott eredmények megértését nehezíti, hogy mind a harman, mind a 2-BFI esetében a WT és az  $\alpha_2$ -AR KO egértörzsek között az alacsonyabb koncentrációknál szignifikáns különbség mutatkozott a kontrakciók gátló hatásában. Ezek alapján felmerül, hogy a két vegyület kötődik az  $\alpha_2$ -AR-khoz és ez felelős a kontrakciók csökkentéséért. Ennek viszont ellentmond, hogy mind a két vegyület alacsony affinitással köt az  $\alpha_2$ -AR-khoz ( $K_i > 10 \mu\text{M}$  a harman és kb. 3700 nM a 2-BFI esetében) [106, 282], így valószínűtlen, hogy a motilitás gátlásában az  $\alpha_2$ -AR-k ilyen kis koncentrációk alkalmazása esetén szerepet kapnának. A kapott eredmények alapján további vizsgálatok elvégzése szükséges a harman és a 2-BFI esetében annak bizonyítására, hogy a gátlást ténylegesen az  $\alpha_2$ -AR-k közvetítik.

A kapott eredményeim alapján összefoglalásként elmondható, hogy habár az IR-kat kimutatták a GI rendszerben, az endogén imidazolin ligandok GI előfordulása szintén bizonyított, a kolinerg gyomorkontrakciók mediálásában ezek a receptorok, illetve ligandjaik nem vesznek részt. A kevert  $\alpha_2$ -AR/IIR ligandok esetében a gátlást az  $\alpha_2$ -AR-k közvetítik, a harman és a 2-BFI általunk nem tisztázott mechanizmuson keresztül váltja ki a motilitást gátló hatását. Viszont további in vitro és in vivo kísérletekre van szükség,

hogy az imidazolin rendszer szerepét tökéletesen tisztázzuk a gyomor motoros aktivitásában.

Végezetül disszertációm zárásaként röviden említeném a dolgozatom szempontjából a fontosabb klinikai relevanciákat. A manapság már széleskörben vérnyomáscsökkentőként alkalmazott I1R iránt nagyobb szelektivitással bíró kevert  $\alpha_2$ -AR/I1R agonista rilmenidin és moxonidin gasztroprotektív hatással is rendelkezik, ezáltal a két vegyület egy további jótékony hatása válna kiaknázhatóvá a klinikumban. Emellett a centrális I1R-k és I2R-k aktivációjával a gyomorvédelem fokozását lehet elérni, így további lehetőség nyílna a peptikus fekély terápiájában.

A DSS-colitises kísérleteim alapján elmondható, hogy az I1R-k nagy valószínűséggel nem befolyásolják a colitis patomechanizmusát. Ezzel szemben az  $\alpha_{2A}$ -AR aktiválása enyhén súlyosbítja a colitist, míg a receptor gátlása szignifikáns gyulladáscsökkentést hoz létre. A moxonidin és a rilmenidin nagy valószínűséggel az IBD-k esetében nem befolyásolják az alapbetegség lefolyását, viszont az adásuk óvatosságra int, hiszen a vegyületek kötődnek  $\alpha_2$ -AR-khoz is, ami felvetheti a colitis súlyosbítását nagyobb dózisok alkalmazásakor. Az  $\alpha_{2A}$ -AR-k colitist súlyosbító szerepe miatt felmerül, hogy IBD-ben szenvedő betegek intenzív terápiájában az  $\alpha_2$ -AR agonista vegyületek (a kevert clonidin, illetve az  $\alpha_2$ -AR agonista dexmedetomidin) súlyosbíthatják a gyulladást. Viszont az  $\alpha_{2A}$ -AR farmakológiai gátlása a szignifikáns gyulladáscsökkentés révén, akár új terápiás célpont is lehet a klinikumban.

Eredményeim alapján a rilmenidin és a moxonidin a fundus motilitását  $\alpha_{2A}$ -AR-n keresztül gátolja, ezáltal a két vegyületnek felmerül a szerepe a motilitászavarok kezelésében. Viszont ez a hatás nem az IR-k által közvetített hatás, hanem a kapott eredmény az irodalomban már leírt adat, miszerint az  $\alpha_{2A}$ -AR-k gátolják a fundus kontrakcióit.

Befejezésül kiemelném, hogy a kapott eredményeim állatkísérleteken alapulnak, további vizsgálatokra, illetve humán adatokra is szükség van a kapott eredmények klinikai relevanciájának tényleges megítélése céljából (jelenleg a három fő témaköröm egyikében sem olvashatunk humán eredményekről).

## **6. KÖVETKEZTETÉSEK**

### **1. Az I1R-k és az I2R-k centrális gasztroprotekción közvetítenek.**

A kapott eredményeim alapján az endogén IR ligand agmatin fokozza a gyomorvédelmet, elsősorban centrális támadásponttal. Farmakológiai analízissel igazoltam, hogy az általa indukált gasztroprotekción mind az I1R-k, az I2R-k, illetve az  $\alpha_2$ -AR-k is szerepet játszanak, és kutatócsoportunk elsőként mutatta ki, hogy a centrális I1R-k illetve I2R-k szelektív aktivációjával önmagában gyomorfédő hatás érhető el. Az agmatinnal végzett további vizsgálataim alapján a centrálisan indukált gasztroprotekción a nervus vagus közvetíti, perifériás faktorként pedig a NO, PG-k, CGRP és a SOM szerepét igazoltam.

### **2. Az I1R-k aktiválása vagy gátlása nem befolyásolja a DSS-colitis lefolyását, míg az $\alpha_2$ -AR-ok aktivációja enyhén súlyosbítja, gátlása mérsékli a bélgyulladás súlyosságát.**

Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta az I1R-k potenciális szerepét a colitis pathomechanizmusában és mutatta ki, hogy ezen receptorok aktivációja vagy gátlása különböző szintetikus vagy endogén ligandokkal nem befolyásolja a DSS-colitis súlyosságát. További kísérleteimmel alátámasztottam az  $\alpha_2$ -AR-k aktivációjának proinflammatorikus hatását a vastagbélben és farmakológiai analízissel illetve KO egerek segítségével elsőként igazoltam, hogy ezt a hatást a három  $\alpha_2$ -AR szubtípus közül az  $\alpha_{2A}$ -AR közvetíti, melynek gátlásával a DSS-colitis súlyossága mérsékelhető.

### **3. Sem az I1R-k, sem az I2R-k nem vesznek részt a kolinerg funduskontrakciók mediálásában**

Kísérleteim során először vizsgáltam és zártam ki az I1R-k és az I2R-k szerepét a gyomorfundus kolinerg kontrakcióinak szabályozásában, és mutattam ki, hogy a kevert  $\alpha_2$ -AR/IR agonisták esetében megfigyelhető gátló hatást kizárólag  $\alpha_2$ -AR-ok mediálják. Eredményeim a korábbi irodalmi adatokkal összhangban arra utalnak, hogy a gátló hatást a három  $\alpha_2$ -AR szubtípus közül az  $\alpha_{2A}$ -AR közvetíti.

Az endogén IR ligand agmatin és harman hatását vizsgálva kimutattam, hogy az előbbi nem befolyásolja, míg az utóbbi enyhén gátolja az izolált gyomorfundus kolinerg

kontrakcióit, mely hatást azonban nem  $\alpha_2$ -AR-ok vagy IR-k, hanem egy további receptor mediálja, mely a jelen kísérletekkel nem lett azonosítva.



## **7. ÖSSZEFOGLALÁS**

Az imidazolin hipotézis alappillért képezi, hogy bizonyos  $\alpha_2$ -AR agonisták egyes hatásait imidazolin receptorokon (IR) keresztül fejtik ki. Mivel az  $\alpha_2$ -AR-k és az IR-k funkcionálisan szorosan kapcsolódnak egymáshoz, ezért doktori munkám során sok esetben párhuzamosan vizsgáltam a két receptor típust. Disszertációmban egyrészt vizsgáltam az I1/I2R-k gasztroprotekcióban betöltött szerepét, az I1R-k és az  $\alpha_2$ -AR-k szerepét a DSS-colitis patomechanizmusában, illetve az I1/I2R-k funkcióját a fundus kontraktilitásának szabályozásában.

Az IR ligandok gasztroprotektív hatásának vizsgálatára a savszekréciótól független alkoholos-fekély modellt alkalmaztam patkányokon. Ez a modell a mukózális védelem, a gyomornyálkahártya épségét és integritását fenntartó faktorok működésének tanulmányozására alkalmas. A kapott eredményeim alapján az endogén imidazolin ligand agmatin centrális gasztroprotekciót közvetített, melyben az I1R és az I2R-k, illetve az  $\alpha_2$ -AR-k is szerepet játszanak. Szelektív IR ligandokkal alátámasztva az eredményeimet az I1R és az I2R ligandok gasztroprotektív hatását igazoltam centrális adagolást követően. Az agmatin hatását egyrészt a nervus vagus, másrészt a perifériás faktorok közül a NO, PG-k, a CGRP és az 5-HT közvetíti.

A kémiai úton indukált colitis modellek egyik legismertebb fajtája a DSS-indukálta colitis modell. Az egereken végzett kísérleteim alapján az I1R-k nem vesznek részt a DSS-colitis lefolyásának szabályozásában. Az  $\alpha_2$ -AR-k aktivációja enyhén súlyosbítja a DSS-colitis kezdeti fázisát, a proinflammatorikus hatásért az  $\alpha_{2A}$ -AR szubtypus a felelős. Míg az  $\alpha_{2A}$ -AR gátlása szignifikáns gyulladáscsökkenést hoz létre, ezt alátámasztja a szöveti MPO szintjének, illetve a CCL3, CXCL2, CXCL13, TIMP-1 és közvetve a G-CSF szintek változása.

Doktori munkám harmadik nagy témakörében az I1R-k és I2R-k szerepét vizsgáltam a fundus kontraktilitásának szabályozásában, egérben. A kapott eredmények alapján a fundus kolinerg kontrakcióinak szabályozásában nem vesznek részt sem az I1R-k, sem az I2R-k. A kevert  $\alpha_2$ -AR/IR agonisták  $\alpha_{2A}$ -AR-n keresztül gátolják az izolált szerv kontrakcióit, dóziszfüggő módon. Az endogén imidazolin ligand harman és a 2-BFI esetében a hatást valószínűleg nem IR-k, hanem egyéb receptorok közvetítik.

## **8. SUMMARY**

The base of the imidazoline hypothesis is that some of the effects of  $\alpha_2$  adrenergic receptor (AR) agonists are mediated by imidazoline receptors (IR). I have examined both types of receptors in parallel in most of the cases, because the  $\alpha_2$ -ARs and IRs are closely connected to each other functionally. In my thesis first I have analyzed the role of the I1/I2Rs in the gastroprotection, secondly the role of the I1Rs and the  $\alpha_2$ -ARs in the pathomechanism of DSS-colitis, finally the role of the I1/I2Rs in the regulation of gastric fundus contractility.

Gastric mucosal damage were induced by acidified ethanol, which is an acid-independent model. This is suitable for analysis of mucosal protection, we can investigate the factors of the gastric mucosal integrity. Our results suggest, that the endogenous IR ligand agmatine induce gastroprotective effect after intracerebroventricular (i.c.v.) administration in rats. The mucosal protection is mediated by I1Rs, I2Rs and  $\alpha_2$ -ARs too. The I1Rs and I2Rs gastroprotective effect were confirmed by using selective IR ligands. The nervus vagus and each of the peripheral gastroprotective factors, like NO, PGs, CGRP, somatostatin, induce the central gastroprotective effects of agmatine.

One of the most famous type of chemically induced colitis models is the DSS-colitis model. It was found based on the examinations performed on mice that I1Rs do not contribute in the regulation of the mechanism of DSS-colitis. The activation of the  $\alpha_2$ -ARs can slightly aggravate the acute phase of DSS-colitis, which proinflammatory effect is mediated by  $\alpha_{2A}$ -AR subtype. The inhibition of  $\alpha_{2A}$ -AR mediate antiinflammatory effect. This results were confirmed with the tissue MPO level and the altered level of CCL3, CXCL2, CXCL13, TIMP-1 and G-CSF.

In the third part of my work I have examined the roles of the I1Rs and I2Rs in the regulation of cholinergic fundic contractility with usage of mice model. Our results indicate that neither the I1Rs and neither the I2Rs do not modulate the cholinergic contraction of fundus. The mixed  $\alpha_2$ -AR/IR agonists inhibit the contractions of isolated organ via  $\alpha_{2A}$ -ARs by dose-dependent manner. The effects are not mediated by IRs but other receptors in cases of the endogenous imidazolin ligand harmane and 2-BFI.

## **9. IRODALOMJEGYZÉK**

- [1] Lenz K, Buder R, Firlinger F, Lohr G, Voglmayr M. Effect of proton pump inhibitors on gastric pH in patients exposed to severe stress. *Wien Klin Wochenschr*, 2015; 127: 51-56.
- [2] Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther*, 2002; 93: 1-35.
- [3] Cussac D, Schaak S, Gales C, Flordellis C, Denis C, Paris H. alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002; 282: F943-952.
- [4] Wu LG, Saggau P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*, 1997; 20: 204-212.
- [5] Drew GM, Whiting SB. Evidence for two distinct types of postsynaptic alpha-adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo. *Br J Pharmacol*, 1979; 67: 207-215.
- [6] Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 1994; 46: 121-136.
- [7] MacDonald E, Scheinin M. Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol*, 1995; 46: 241-258.
- [8] Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT, Jr. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994; 21: 133-149.
- [9] Tavares A, Handy DE, Bogdanova NN, Rosene DL, Gavras H. Localization of alpha 2A- and alpha 2B-adrenergic receptor subtypes in brain. *Hypertension*, 1996; 27: 449-455.
- [10] Wang GS, Chang NC, Wu SC, Chang AC. Regulated expression of alpha2B adrenoceptor during development. *Dev Dyn*, 2002; 225: 142-152.

- [11] Blaxall HS, Hass NA, Bylund DB. Expression of alpha 2-adrenergic receptor genes in rat tissues. *Receptor*, 1994; 4: 191-199.
- [12] Shi TS, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hokfelt T. Distribution and regulation of alpha(2)-adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain*, 2000; 84: 319-330.
- [13] Bylund DB. Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci*, 1988; 9: 356-361.
- [14] Blandizzi C. Enteric alpha-2 adrenoceptors: pathophysiological implications in functional and inflammatory bowel disorders. *Neurochem Int*, 2007; 51: 282-288.
- [15] Gyires K, Zadori ZS, Torok T, Matyus P. alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int*, 2009; 55: 447-453.
- [16] Paton WD, Vizi ES. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol*, 1969; 35: 10-28.
- [17] Blandizzi C, Natale G, Colucci R, Carignani D, Lazzeri G, Del Tacca M. Characterization of alpha 2-adrenoceptor subtypes involved in the modulation of gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol*, 1995; 278: 179-182.
- [18] Fulop K, Zadori Z, Ronai AZ, Gyires K. Characterisation of alpha2-adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. *Eur J Pharmacol*, 2005; 528: 150-157.
- [19] Zadori ZS, Shujaa N, Fulop K, Dunkel P, Gyires K. Pre- and postsynaptic mechanisms in the clonidine- and oxymetazoline-induced inhibition of gastric motility in the rat. *Neurochem Int*, 2007; 51: 297-305.
- [20] Gyires K, Ronai AZ, Mullner K, Furst S. Intracerebroventricular injection of clonidine releases beta-endorphin to induce mucosal protection in the rat. *Neuropharmacology*, 2000; 39: 961-968.
- [21] Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Minorics R, Falkay G, Matyus P. Analysis of the role of central and peripheral alpha2-adrenoceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat. *Neurochem Int*, 2007; 51: 289-296.
- [22] Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Central alpha 2-adrenergic control of the pattern of small intestinal motility in rats. *Gastroenterology*, 1986; 91: 1470-1475.

- [23] Hildebrand KR, Lin G, Murtaugh MP, Brown DR. Molecular characterization of alpha 2-adrenergic receptors regulating intestinal electrolyte transport. *Mol Pharmacol*, 1993; 43: 23-29.
- [24] Croci T, Bianchetti A. Stimulation of faecal excretion in rats by alpha 2-adrenergic antagonists. *J Pharm Pharmacol*, 1992; 44: 358-360.
- [25] Andresen V, Camilleri M. Irritable bowel syndrome: recent and novel therapeutic approaches. *Drugs*, 2006; 66: 1073-1088.
- [26] Bharucha AE, Camilleri M, Zinsmeister AR, Hanson RB. Adrenergic modulation of human colonic motor and sensory function. *Am J Physiol*, 1997; 273: G997-1006.
- [27] Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol*, 1994; 152: 3024-3031.
- [28] Ruffolo RR, Turowski BS, Patil PN. Lack of cross-desensitization between structurally dissimilar alpha-adrenoceptor agonists. *J Pharm Pharmacol*, 1977; 29: 378-380.
- [29] Vollmer RR, Buckley JP. Central cardiovascular effects of phentolamine in chloralose-anesthetized cats. *Eur J Pharmacol*, 1977; 43: 17-25.
- [30] Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984; 230: 232-236.
- [31] Regunathan S, Reis DJ. Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996; 36: 511-544.
- [32] Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, Collins LA, Westbrook KL, Johnson GG. I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1995; 763: 22-42.
- [33] Ernsberger P. The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 881: 35-53.
- [34] Wang H, Regunathan S, Ruggiero DA, Reis DJ. Production and characterization of antibodies specific for the imidazoline receptor protein. *Mol Pharmacol*, 1993; 43: 509-515.

- [35] Escriba PV, Sastre M, Wang H, Regunathan S, Reis DJ, Garcia-Sevilla JA. Immunodetection of putative imidazoline receptor proteins in the human and rat brain and other tissues. *Neurosci Lett*, 1994; 178: 81-84.
- [36] Keller B, Garcia-Sevilla JA. Immunodetection and subcellular distribution of imidazoline receptor proteins with three antibodies in mouse and human brains: Effects of treatments with I1- and I2-imidazoline drugs. *J Psychopharmacol*, 2015; 29: 996-1012.
- [37] Piletz JE, Ivanov TR, Sharp JD, Ernsberger P, Chang CH, Pickard RT, Gold G, Roth B, Zhu H, Jones JC, Baldwin J, Reis DJ. Imidazoline receptor antisera-selected (IRAS) cDNA: cloning and characterization. *DNA Cell Biol*, 2000; 19: 319-329.
- [38] Alahari SK, Lee JW, Juliano RL. Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration. *J Cell Biol*, 2000; 151: 1141-1154.
- [39] Farsang C, Kapocsi J. Imidazoline receptors: from discovery to antihypertensive therapy (facts and doubts). *Brain Res Bull*, 1999; 49: 317-331.
- [40] Kimura A, Tyacke RJ, Minchin MC, Nutt DJ, Hudson AL. Identification of an I(2) binding protein from rabbit brain. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 364-366.
- [41] Holt A, Wieland B, Baker GB. Allosteric modulation of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in vitro by imidazoline receptor ligands. *Br J Pharmacol*, 2004; 143: 495-507.
- [42] Lalies MD, Hibell A, Hudson AL, Nutt DJ. Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline2 site-selective ligands. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 881: 114-117.
- [43] Paterson LM, Robinson ES, Nutt DJ, Hudson AL. In vivo estimation of imidazoline(2) binding site turnover. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 367-370.
- [44] Ozaita A, Olmos G, Boronat MA, Lizcano JM, Unzeta M, Garcia-Sevilla JA. Inhibition of monoamine oxidase A and B activities by imidazol(ine)/guanidine drugs, nature of the interaction and distinction from I2-imidazoline receptors in rat liver. *Br J Pharmacol*, 1997; 121: 901-912.
- [45] Efendic S, Efanov AM, Berggren PO, Zaitsev SV. Two generations of insulinotropic imidazoline compounds. *Diabetes*, 2002; 51 Suppl 3: S448-454.

- [46] Hoy M, Olsen HL, Bokvist K, Petersen JS, Gromada J. The imidazoline NNC77-0020 affects glucose-dependent insulin, glucagon and somatostatin secretion in mouse pancreatic islets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003; 368: 284-293.
- [47] Morgan NG, Cooper EJ, Squires PE, Hills CE, Parker CA, Hudson AL. Comparative effects of efaroxan and beta-carbolines on the secretory activity of rodent and human beta cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 167-174.
- [48] Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Monassier L, Gonon F, Bousquet P. Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-preferring receptors. *Eur J Pharmacol*, 1991; 209: 213-221.
- [49] Trimarco B, Rosiello G, Sarno D, Lorino G, Rubattu S, DeLuca N, Volpe M. Effects of one-year treatment with rilmenidine on systemic hypertension-induced left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Am J Cardiol*, 1994; 74: 36a-42a.
- [50] Koldas L, Ayan F, Ikitimur B. Short-term effects of rilmenidine on left ventricular hypertrophy and systolic and diastolic function in patients with essential hypertension: comparison with an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium antagonist. *Jpn Heart J*, 2003; 44: 693-704.
- [51] Sattar MA, Yusof AP, Gan EK, Sam TW, Johns EJ. Acute renal failure in 2K2C Goldblatt hypertensive rats during antihypertensive therapy: comparison of an angiotensin AT1 receptor antagonist and clonidine analogues. *J Auton Pharmacol*, 2000; 20: 297-304.
- [52] Armah BI, Hofferber E, Stenzel W. General pharmacology of the novel centrally acting antihypertensive agent moxonidine. *Arzneimittelforschung*, 1988; 38: 1426-1434.
- [53] Gorbea-Oppliger VJ, Fink GD. Clonidine reverses the slowly developing hypertension produced by low doses of angiotensin II. *Hypertension*, 1994; 23: 844-847.
- [54] Cohn JN. Sympathetic nervous system in heart failure. *Circulation*, 2002; 106: 2417-2418.

- [55] Cohn JN, Pfeffer MA, Rouleau J, Sharpe N, Swedberg K, Straub M, Wiltse C, Wright TJ. Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). *Eur J Heart Fail*, 2003; 5: 659-667.
- [56] Swedberg K, Bergh CH, Dickstein K, McNay J, Steinberg M. The effects of moxonidine, a novel imidazoline, on plasma norepinephrine in patients with congestive heart failure. Moxonidine Investigators. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35: 398-404.
- [57] Evans RG. Current status of putative imidazoline (I1) receptors and renal mechanisms in relation to their antihypertensive therapeutic potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996; 23: 845-854.
- [58] Smyth DD, Penner SB. Renal I1-imidazoline-selective compounds mediate natriuresis in rat lung. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995; 26 (suppl. 2):S63-S67.
- [59] Penner SB, Smyth DD. Renal denervation altered hemodynamic and adrenal effects following intracerebroventricular administration of the I1-imidazoline receptor agonist, rilmenidine in pentobarbital anaesthetised rats. *Neurochem Int*; 1997; 30(1) 55-62.
- [60] Andrade CA, Oliveira LB, Martinez G, Silva DC, De Luca LA, Jr., Menani JV. Involvement of forebrain imidazoline and alpha(2)-adrenergic receptors in the antidipsogenic response to moxonidine. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 262-264.
- [61] Haenni A, Lithell H. Moxonidine improves insulin sensitivity in insulin-resistant hypertensives. *J Hypertens Suppl*, 1999; 17: S29-35.
- [62] Sener A, Lebrun P, Blachier F, Malaisse WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Insulinotropic action of agmatine. *Biochem Pharmacol*, 1989; 38: 327-330.
- [63] Weitzel G, Pfeiffer B, Stock W. Insulin-like partial effects of agmatine derivatives in adipocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1980; 361: 51-60.
- [64] Garcia-Sevilla J, Miralles A, Sastre M, Escriba PV, Olmos G, Meana JJ. I2-imidazoline receptors in the healthy and pathologic human brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1995; 763: 178-193.
- [65] Tonello R, Villarinho JG, da Silva Sant'Anna G, Tamiozzo L, Machado P, Trevisan G, Pinto Martins MA, Ferreira J, Rubin MA. The potential



- antidepressant-like effect of imidazoline I<sub>2</sub> ligand 2-BFI in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012; 37: 15-21.
- [66] Reynolds GP, Boulton RM, Pearson SJ, Hudson AL, Nutt DJ. Imidazoline binding sites in Huntington's and Parkinson's disease putamen. *Eur J Pharmacol*, 1996; 301: R19-21.
- [67] Sastre M, Ventayol P, Garcia-Sevilla JA. Decreased density of I<sub>2</sub>-imidazoline receptors in the postmortem brain of heroin addicts. *Neuroreport*, 1996; 7: 509-512.
- [68] Diaz A, Mayet S, Dickenson AH. BU-224 produces spinal antinociception as an agonist at imidazoline I<sub>2</sub> receptors. *Eur J Pharmacol*, 1997; 333: 9-15.
- [69] Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *Eur J Pharmacol*, 1996; 296: 17-22.
- [70] Jackson HC, Griffin IJ, Nutt DJ. The effects of idazoxan and other alpha 2-adrenoceptor antagonists on food and water intake in the rat. *Br J Pharmacol*, 1991; 104: 258-262.
- [71] Polidori C, Gentili F, Pignini M, Quaglia W, Panocka I, Massi M. Hyperphagic effect of novel compounds with high affinity for imidazoline I(2) binding sites. *Eur J Pharmacol*, 2000; 392: 41-9.
- [72] Ernsberger P, Koletsky RJ, Collins LA, Bedol D. Sympathetic nervous system in salt-sensitive and obese hypertension: amelioration of multiple abnormalities by a central sympatholytic agent. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1996; 10 Suppl 1: 275-282.
- [73] Atlas D, Burstein Y. Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. *Eur J Biochem*, 1984; 144: 287-293.
- [74] Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 1994; 263: 966-969.
- [75] Berkels R, Taubert D, Grundemann D, Schomig E. Agmatine signaling: odds and threads. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004; 22: 7-16.
- [76] Reis DJ, Regunathan S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 881: 65-80.

- [77] Molderings GJ, Heinen A, Menzel S, Lubbecke F, Homann J, Gothert M. Gastrointestinal uptake of agmatine: distribution in tissues and organs and pathophysiologic relevance. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 44-51.
- [78] Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci*, 1995; 56: 2319-2330.
- [79] Otake K, Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 1998; 787: 1-14.
- [80] Li J, Li X, Pei G, Qin BY. Analgesic effect of agmatine and its enhancement on morphine analgesia in mice and rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1999; 20: 81-85.
- [81] Khoshnoodi MA, Motiei-Langroudi R, Tahsili-Fahadan P, Yahyavi-Firouz-Abadi N, Ghahremani MH, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide system in enhancement of morphine-induced conditioned place preference by agmatine in male mice. *Neurosci Lett*, 2006; 399: 234-239.
- [82] Su RB, Ren YH, Liu Y, Ding T, Lu XQ, Wu N, Liu ZM, Li J. Agmatine inhibits morphine-induced drug discrimination in rats. *Eur J Pharmacol*, 2008; 593: 62-67.
- [83] Aricioglu-Kartal F, Uzbay IT. Inhibitory effect of agmatine on naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats. *Life Sci*, 1997; 61: 1775-1781.
- [84] Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 2012; 133: 351-365.
- [85] Gao Y, Li F, Wu N, Su RB, Liu Y, Lu XQ, Liu Y, Li J. Effect of agmatine on DAMGO-induced mu-opioid receptor down-regulation and internalization via activation of IRAS, a candidate for imidazoline I(1) receptor. *Eur J Pharmacol*, 2008; 599: 18-23.
- [86] Regunathan S, Piletz JE. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 20-29.
- [87] Arndt MA, Battaglia V, Parisi E, Lortie MJ, Isome M, Baskerville C, Pizzo DP, Ientile R, Colombatto S, Toninello A, Satriano J. The arginine metabolite

- agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009; 296: C1411-1419.
- [88] Kim JH, Yenari MA, Giffard RG, Cho SW, Park KA, Lee JE. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp Neurol*, 2004; 189: 122-130.
- [89] Aricioglu F, Kan B, Yillar O, Korcegez E, Berkman K. Effect of agmatine on electrically and chemically induced seizures in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 141-146.
- [90] Singh T, Bagga N, Kaur A, Kaur N, Gawande DY, Goel RK. Agmatine for combined treatment of epilepsy, depression and cognitive impairment in chronic epileptic animals. *Biomed Pharmacother*, 2017; 92: 720-725.
- [91] Leitch B, Shevtsova O, Reusch K, Bergin DH, Liu P. Spatial learning-induced increase in agmatine levels at hippocampal CA1 synapses. *Synapse*, 2011; 65: 146-153.
- [92] Molderings GJ, Gothert M. Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from I1- and I2-imidazoline binding sites. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1995; 351: 507-116.
- [93] Li XT, Duan HR, He RR. Inhibition by agmatine on spontaneous activity of rabbit atrioventricular node cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2000; 21: 931-935.
- [94] Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC, Blantz RC. Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest*, 1996; 97: 413-420.
- [95] Robinson ES, Anderson NJ, Crosby J, Nutt DJ, Hudson AL. Endogenous beta-carbolines as clonidine-displacing substances. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 157-166.
- [96] Rommelspacher H, May T, Susilo R. beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines: Detection and Function in Mammals. *Planta Med*, 1991; 57: S85-92.
- [97] Spijkerman R, van den Eijnden R, van de Mheen D, Bongers I, Fekkes D. The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2002; 12: 61-71.

- [98] Beck O, Faull KF. Concentrations of the enantiomers of 5-hydroxymethtryptoline in mammalian urine: implications for in vivo biosynthesis. *Biochem Pharmacol*, 1986; 35: 2636-2639.
- [99] Loew GH, Nienow J, Lawson JA, Toll L, Uyeno ET. Theoretical structure-activity studies of beta-carboline analogs. Requirements for benzodiazepine receptor affinity and antagonist activity. *Mol Pharmacol*, 1985; 28: 17-31.
- [100] Strombom J, Jokela R, Saano V, Rolfsen W. Binding of strychnocarpine and related beta-carbolines to brain receptors in vitro. *Eur J Pharmacol*, 1992; 214: 165-168.
- [101] Skup M, Oderfeld-Nowak B, Rommelspacher H. In vitro studies on the effect of beta-carbolines on the activities of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase and on the muscarinic receptor binding of the rat brain. *J Neurochem*, 1983; 41: 62-68.
- [102] Musgrave IF, Van Der Zypp A, Grigg M, Barrow CJ. Endogenous imidazoline receptor ligands relax rat aorta by an endothelium-dependent mechanism. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 222-227.
- [103] Lichtenberg-Kraag B, Klinker JF, Muhlbauer E, Rommelspacher H. The natural beta-carbolines facilitate inositol phosphate accumulation by activating small G-proteins in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Neuropharmacology*, 1997; 36: 1771-1778.
- [104] Rommelspacher H, May T, Salewski B. Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur J Pharmacol*, 1994; 252: 51-59.
- [105] Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, Smith C, Egan C, Davis K, Mattson MV. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub>) and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend*, 2000; 60: 121-132.
- [106] Husbands SM, Glennon RA, Gorgerat S, Gough R, Tyacke R, Crosby J, Nutt DJ, Lewis JW, Hudson AL. beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend*, 2001; 64: 203-208.

- [107] Musgrave IF, Badoer E. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I(1)-imidazoline receptors. *Br J Pharmacol*, 2000; 129: 1057-1059.
- [108] Adell A, Biggs TA, Myers RD. Action of harman (1-methyl-beta-carboline) on the brain: body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. *Neuropharmacology*, 1996; 35: 1101-1107.
- [109] Aricioglu F, Altunbas H. Harmane induces anxiolysis and antidepressant-like effects in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 196-201.
- [110] Prell GD, Martinelli GP, Holstein GR, Matulic-Adamic J, Watanabe KA, Chan SL, Morgan NG, Haxhiu MA, Ernsberger P. Imidazoleacetic acid-ribotide: an endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101: 13677-13682.
- [111] Friedrich VL, Jr., Martinelli GP, Prell GD, Holstein GR. Distribution and cellular localization of imidazoleacetic acid-ribotide, an endogenous ligand at imidazol(in)e and adrenergic receptors, in rat brain. *J Chem Neuroanat*, 2007; 33: 53-64.
- [112] Bozdagi O, Wang XB, Martinelli GP, Prell G, Friedrich VL, Jr., Huntley GW, Holstein GR. Imidazoleacetic acid-ribotide induces depression of synaptic responses in hippocampus through activation of imidazoline receptors. *J Neurophysiol*, 2011; 105: 1266-1275.
- [113] Wikberg JE, Uhlen S, Chhajlani V. Medetomidine stereoisomers delineate two closely related subtypes of idazoxan (imidazoline) I-receptors in the guinea pig. *Eur J Pharmacol*, 1991; 193: 335-340.
- [114] Tesson F, Limon I, Parini A. Tissue-specific localization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive sites. *Eur J Pharmacol*, 1992; 219: 335-338.
- [115] Molderings GJ, Donecker K, Burian M, Simon WA, Schroder DW, Gothert M. Characterization of I2 imidazoline and sigma binding sites in the rat and human stomach. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998; 285: 170-177.
- [116] Dontenwill M, Pascal G, Piletz JE, Chen M, Baldwin J, Ronde P, Dupuy L, Urošević D, Grenéy H, Takeda K, Bousquet P. IRAS, the human homologue of Nischarin, prolongs survival of transfected PC12 cells. *Cell Death Differ*, 2003; 10: 933-935.

- [117] Zhang J, Abdel-Rahman AA. Nischarin as a functional imidazoline (I1) receptor. *FEBS Lett*, 2006; 580: 3070-3074.
- [118] Ding Y, Zhang R, Zhang K, Lv X, Chen Y, Li A, Wang L, Zhang X, Xia Q. Nischarin is differentially expressed in rat brain and regulates neuronal migration. *PLoS One*, 2013; 8: e54563.
- [119] Colucci R, Blandizzi C, Carignani D, Placanica G, Lazzeri G, Del Tacca M. Effects of imidazoline derivatives on cholinergic motility in guinea-pig ileum: involvement of presynaptic  $\alpha$ 2-adrenoceptors or imidazoline receptors? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1998; 357: 682-691.
- [120] Glavin GB, Smyth DD. Effects of the selective I1 imidazoline receptor agonist, moxonidine, on gastric secretion and gastric mucosal injury in rats. *Br J Pharmacol*, 1995; 114: 751-754.
- [121] Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 274: 741-744.
- [122] Utkan T, Ulak G, Yildiran HG, Yardimoglu M, Gacar MN. Investigation on the mechanism involved in the effects of agmatine on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Life Sci*, 2000; 66: 1705-1711.
- [123] Gyires K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Curr Med Chem*, 2005; 12: 203-215.
- [124] Davenport HW. Is the apparent hyposecretion of acid by patients with gastric ulcer a consequence of a broken barrier to diffusion of hydrogen ions into the gastric mucosa? *Gut*, 1965; 6: 513.
- [125] Wallace JL, Syer S, Denou E, de Palma G, Vong L, McKnight W, Jury J, Bolla M, Bercik P, Collins SM, Verdu E, Ongini E. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*, 2011; 141: 1314-22, 1322.e1-5.
- [126] Eusebi LH, Rabitti S, Artesiani ML, Gelli D, Montagnani M, Zagari RM, Bazzoli F. Proton pump inhibitors: Risks of long-term use. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017; 32: 1295-1302.

- [127] Lewis PO, Litchfield JM, Tharp JL, Garcia RM, Pourmorteza M, Reddy CM. Risk and Severity of Hospital-Acquired *Clostridium difficile* Infection in Patients Taking Proton Pump Inhibitors. *Pharmacotherapy*, 2016; 36: 986-993.
- [128] Palkovits M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol*, 1999; 20: 270-295.
- [129] Tache Y, Stephens RL, Jr., Ishikawa T. Central nervous system action of TRH to influence gastrointestinal function and ulceration. *Ann N Y Acad Sci*, 1989; 553: 269-285.
- [130] Henagan JM, Smith GS, Seidel ER, Miller TA. Influence of vagotomy on mucosal protection against alcohol-induced gastric damage in the rat. *Gastroenterology*, 1984; 87: 903-908.
- [131] Mozsik G, Kiraly A, Garamszegi M, Javor T, Nagy L, Suto G, Toth G, Vincze A. Failure of prostacyclin, beta-carotene, atropine and cimetidine to produce gastric cyto- and general mucosal protection in surgically vagotomized rats. *Life Sci*, 1991; 49: 1383-1389.
- [132] Gyires K. Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. *Curr Top Med Chem*, 2004; 4: 63-73.
- [133] Tache Y. Brainstem neuropeptides and vagal protection of the gastric mucosal against injury: role of prostaglandins, nitric oxide and calcitonin-gene related peptide in capsaicin afferents. *Curr Med Chem*, 2012; 19: 35-42.
- [134] Gyires K, Feher A. Stress, Neuropeptides and Gastric Mucosa. *Curr Pharm Des*, 2017; 23: 3928-3940.
- [135] Kauffman GL. Stress, the brain, and the gastric mucosa. *Am J Surg*, 1997; 174: 271-275.
- [136] Ray A, Henke PG, Sullivan RM. Effects of intra-amygdalar thyrotropin releasing hormone (TRH) and its antagonism by atropine and benzodiazepines during stress ulcer formation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1990; 36: 597-601.
- [137] Holzer P. Chemosensitive afferent nerves in the regulation of gastric blood flow and protection. *Adv Exp Med Biol*, 1995; 371b: 891-5.
- [138] Magierowski M, Jasnos K, Kwiecien S, Drozdowicz D, Surmiak M, Strzalka M, Ptak-Belowska A, Wallace JL, Brzozowski T. Endogenous prostaglandins and

- afferent sensory nerves in gastroprotective effect of hydrogen sulfide against stress-induced gastric lesions. *PLoS One*, 2015; 10: e0118972.
- [139] Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, 1979; 77: 433-443.
- [140] Tanaka T, Guth P, Tache Y. Role of nitric oxide in gastric hyperemia induced by central vagal stimulation. *Am J Physiol*, 1993; 264: G280-284.
- [141] Kato K, Matsuno Y, Matsuo Y, Shimamura M, Tanaka K, Murai I, Imai S. Role of mucosal prostaglandins in vagally-mediated adaptive cytoprotection in the rat. *Gastroenterol Jpn*, 1992; 27: 1-8.
- [142] Yang H, Stephens RL, Tache Y. TRH analogue microinjected into specific medullary nuclei stimulates gastric serotonin secretion in rats. *Am J Physiol*, 1992; 262: G216-222.
- [143] Holzer P, Lippe IT. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. *Neuroscience*, 1988; 27: 981-987.
- [144] Holzer P, Livingston EH, Saria A, Guth PH. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol*, 1991; 260: G363-370.
- [145] Lembeck F, Gamse R. Substance P in peripheral sensory processes. *Ciba Found Symp*, 1982: 35-54.
- [146] Jancso G, Hokfelt T, Lundberg JM, Kiraly E, Halasz N, Nilsson G, Terenius L, Rehfeld J, Steinbusch H, Verhofstad A, Elde R, Said S, Brown M. Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-hydroxytryptamine. *J Neurocytol*, 1981; 10: 963-980.
- [147] Holzer P. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology*, 1998; 114: 823-839.
- [148] Lambrecht N, Burchert M, Respondek M, Muller KM, Peskar BM. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat. *Gastroenterology*, 1993; 104: 1371-1380.



- [149] Evangelista S, Tramontana M, Maggi CA. Pharmacological evidence for the involvement of multiple calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in the antisecretory and antiulcer effect of CGRP in rat stomach. *Life Sci*, 1992; 50: P113-118.
- [150] Manela FD, Ren J, Gao J, McGuigan JE, Harty RF. Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology*, 1995; 109: 701-706.
- [151] Iyo AH, Zhu MY, Ordway GA, Regunathan S. Expression of arginine decarboxylase in brain regions and neuronal cells. *J Neurochem*, 2006; 96: 1042-1050.
- [152] Silva BR, Paula TD, Paulo M, Bendhack LM. Nitric oxide signaling and the cross talk with prostanoids pathways in vascular system. *Med Chem*, 2016.
- [153] Hoang KG, Allison S, Murray M, Petrovic N. Prostanoids regulate angiogenesis acting primarily on IP and EP4 receptors. *Microvasc Res*, 2015; 101: 127-134.
- [154] Del Tacca M, Soldani G, Bernardini C, Martinotti E, Impicciatore M. Pharmacological studies on the mechanisms underlying the inhibitory and excitatory effects of clonidine on gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol*, 1982; 81: 255-261.
- [155] Bhandare PN, Rataboli PV, D'Souza RS. Dual action of clonidine on ethanol-induced gastric lesions: is the imidazoline-preferring receptor involved? *Eur J Pharmacol*, 1991; 199: 243-245.
- [156] Houi N, Kamisaki Y, Itoh T. Effects of histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists on acid secretion stimulated by imidazoline derivatives in isolated parietal cells. *Eur J Pharmacol*, 1987; 144: 67-76.
- [157] Molderings GJ, Burian M, Menzel S, Donecker K, Homann J, Nilius M, Gothert M. Imidazoline recognition sites and stomach function. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 881: 332-343.
- [158] Carlisle MA, Smyth DD, Glavin GB. Efaroxan acts peripherally to block the antisecretory and gastroprotective effects of moxonidine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 274: 598-601.
- [159] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2007; 448: 427-434.

- [160] Gyires K, Toth EV, Zadori SZ. Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. *Curr Pharm Des*, 2014; 20: 1063-1081.
- [161] Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*, 2012; 380: 1590-1605.
- [162] Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2014; 14: 329-342.
- [163] Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007; 59: 1073-1083.
- [164] Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2007; 25: 221-242.
- [165] Bryant RV, Brain O, Travis SP. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2015; 50: 90-112.
- [166] Molderings GJ, Bonisch H, Bruss M, Wolf C, von Kugelgen I, Gothert M. S1P-receptors in PC12 and transfected HEK293 cells: molecular targets of hypotensive imidazoline I(1) receptor ligands. *Neurochem Int*, 2007; 51: 476-485.
- [167] Molderings GJ, Gothert M, von Kugelgen I. Characterization of an antiproliferative effect of imidazoline receptor ligands on PC12 cells. *Pharmacol Rep*, 2007; 59: 789-794.
- [168] Daniel C, Sartory N, Zahn N, Geisslinger G, Radeke HH, Stein JM. FTY720 ameliorates Th1-mediated colitis in mice by directly affecting the functional activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*, 2007; 178: 2458-2468.
- [169] Deguchi Y, Andoh A, Yagi Y, Bamba S, Inatomi O, Tsujikawa T, Fujiyama Y. The S1P receptor modulator FTY720 prevents the development of experimental colitis in mice. *Oncol Rep*, 2006; 16: 699-703.
- [170] Lechin F, van der Dijs B, Insausti CL, Gomez F, Villa S, Lechin AE, Arocha L, Oramas O. Treatment of ulcerative colitis with clonidine. *J Clin Pharmacol*, 1985; 25: 219-226.
- [171] Poyhonen-Alho MK, Manhem K, Katzman P, Kibarskis A, Antikainen RL, Erkkola RU, Tuomilehto JO, Ebeling PE, Kaaja RJ. Central sympatholytic therapy has anti-inflammatory properties in hypertensive postmenopausal women. *J Hypertens*, 2008; 26: 2445-2449.

- [172] Talley NJ, Ford AC. Functional Dyspepsia. *N Engl J Med*, 2015; 373: 1853-1863.
- [173] Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology*, 2006; 130: 1466-1479.
- [174] Tack J, Bisschops R, Sarnelli G. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1239-1255.
- [175] Wilmer A, Van Cutsem E, Andrioli A, Tack J, Coremans G, Janssens J. Ambulatory gastrojejunal manometry in severe motility-like dyspepsia: lack of correlation between dysmotility, symptoms, and gastric emptying. *Gut*, 1998; 42: 235-242.
- [176] Schwartz MP, Samsom M, Smout AJ. Chemospecific alterations in duodenal perception and motor response in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol*, 2001; 96: 2596-2602.
- [177] Simren M, Vos R, Janssens J, Tack J. Unsuppressed postprandial phasic contractility in the proximal stomach in functional dyspepsia: relevance to symptoms. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98: 2169-2175.
- [178] Delgado-Aros S, Camilleri M, Cremonini F, Ferber I, Stephens D, Burton DD. Contributions of gastric volumes and gastric emptying to meal size and postmeal symptoms in functional dyspepsia. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1685-1694.
- [179] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, Haruma K, Asaka M, Uemura N, Malfertheiner P. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 2015; 64: 1353-1367.
- [180] Moayyedi P, Delaney BC, Vakil N, Forman D, Talley NJ. The efficacy of proton pump inhibitors in nonulcer dyspepsia: a systematic review and economic analysis. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1329-1337.
- [181] Talley NJ, Vakil NB, Moayyedi P. American gastroenterological association technical review on the evaluation of dyspepsia. *Gastroenterology*, 2005; 129: 1756-1780.
- [182] Hondeghem LM. Domperidone: limited benefits with significant risk for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013; 61: 218-225.
- [183] Talley NJ, Tack J, Ptak T, Gupta R, Giguere M. Itopride in functional dyspepsia: results of two phase III multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Gut*, 2008; 57: 740-746.

- [184] Talley NJ, Locke GR, Saito YA, Almazan AE, Bouras EP, Howden CW, Lacy BE, DiBaise JK, Prather CM, Abraham BP, El-Serag HB, Moayyedi P, Herrick LM, Szarka LA, Camilleri M, Hamilton FA, Schleck CD, Tilkes KE, Zinsmeister AR. Effect of Amitriptyline and Escitalopram on Functional Dyspepsia: A Multicenter, Randomized Controlled Study. *Gastroenterology*, 2015; 149: 340-349.e2.
- [185] Gilja OH, Hausken T, Bang CJ, Berstad A. Effect of glyceryl trinitrate on gastric accommodation and symptoms in functional dyspepsia. *Dig Dis Sci*, 1997; 42: 2124-2131.
- [186] Thumshirn M, Camilleri M, Choi MG, Zinsmeister AR. Modulation of gastric sensory and motor functions by nitrenergic and alpha2-adrenergic agents in humans. *Gastroenterology*, 1999; 116: 573-585.
- [187] Molderings GJ, Likungu J, Jakschik J, Gothert M. Presynaptic imidazoline receptors and non-adrenoceptor [3H]-idazoxan binding sites in human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol*, 1997; 122: 43-50.
- [188] Molderings GJ, Likungu J, Gothert M. Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1999; 360: 157-164.
- [189] Felsen D, Ernsberger P, Meeley MP, Reis DJ. Clonidine displacing substance is biologically active on smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 1987; 142: 453-455.
- [190] Ernsberger P, Damon TH, Graff LM, Schafer SG, Christen MO. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993; 264: 172-182.
- [191] Gyires K, Ronai AZ, Zadori ZS, Toth VE, Nemeth J, Szekeres M, Hunyady L. Angiotensin II-induced activation of central AT1 receptors exerts endocannabinoid-mediated gastroprotective effect in rats. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382: 971-978.
- [192] Szabo S, Pihan G. Development and significance of cysteamine and propionitrile models of duodenal ulcer. *Chronobiol Int*, 1987; 4: 31-42.
- [193] Gyires K. Morphine inhibits the ethanol-induced gastric damage in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1990; 306: 170-181.

- [194] Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014; 18: 279-288.
- [195] Schwartz L, Abolhassani M, Pooya M, Steyaert JM, Wertz X, Israel M, Guais A, Chaumet-Riffaud P. Hyperosmotic stress contributes to mouse colonic inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008; 295: G934-941.
- [196] Jadert C, Phillipson M, Holm L, Lundberg JO, Borniquel S. Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease. *Redox Biol*, 2014; 2: 73-81.
- [197] Cobos-Puc LE, Villalon CM, Ramirez-Rosas MB, Sanchez-Lopez A, Lozano-Cuenca J, Gomez-Diaz B, MaassenVanDenBrink A, Centurion D. Pharmacological characterization of the inhibition by moxonidine and agmatine on the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur J Pharmacol*, 2009; 616: 175-182.
- [198] Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Al-Khrasani M, Pap B, Mozes MM, Matyus P. Pharmacological analysis of alpha(2)-adrenoceptor subtypes mediating analgesic, anti-inflammatory and gastroprotective actions. *Inflammopharmacology*, 2009; 17: 171-179.
- [199] Zeidan MP, Zomkowski AD, Rosa AO, Rodrigues AL, Gabilan NH. Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, 2007; 565: 125-131.
- [200] Zhu QM, Lesnick JD, Jasper JR, MacLennan SJ, Dillon MP, Eglen RM, Blue DR, Jr. Cardiovascular effects of rilmenidine, moxonidine and clonidine in conscious wild-type and D79N alpha2A-adrenoceptor transgenic mice. *Br J Pharmacol*, 1999; 126: 1522-1530.
- [201] Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Philipp K, Nemeth J, Gyires K. Evidence for the gastric cytoprotective effect of centrally injected agmatine. *Brain Res Bull*, 2014; 108: 51-59.
- [202] Nguyen TT, Matsumoto K, Yamasaki K, Watanabe H. Involvement of supraspinal GABA receptors in majonoside-R2 suppression of clonidine-induced antinociception in mice. *Life Sci*, 1997; 61: 427-436.

- [203] Tank J, Jordan J, Diedrich A, Obst M, Plehm R, Luft FC, Gross V. Clonidine improves spontaneous baroreflex sensitivity in conscious mice through parasympathetic activation. *Hypertension*, 2004; 43: 1042-1047.
- [204] Bhalla S, Ali I, Andurkar SV, Gulati A. Centhaquin antinociception in mice is mediated by alpha2A- and alpha2B- but not alpha2C-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 2013; 715: 328-336.
- [205] Timar J, Sobor M, Kiraly KP, Gyarmati S, Riba P, Al-Khrasani M, Furst S. Peri, pre and postnatal morphine exposure: exposure-induced effects and sex differences in the behavioural consequences in rat offspring. *Behav Pharmacol*, 2010; 21: 58-68.
- [206] Vane JR. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother*, 1957; 12: 344-349.
- [207] Nemeth J, Helyes Z, Gorcs T, Gardi J, Pinter E, Szolcsanyi J. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol Hung*, 1996; 84: 313-315.
- [208] Nemeth J, Gorcs T, Helyes Z, Oroszi G, Kocsy T, Pinter E, Szolcsanyi J. Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp)*, 1998; 6: 473-475.
- [209] Szitter I, Pinter E, Perkecz A, Kemeny A, Kun J, Kereskai L, Pietra C, Quinn JP, Zimmer A, Berger A, Paige CJ, Helyes Z. Role of neurokinin 1 receptors in dextran sulfate-induced colitis: studies with gene-deleted mice and the selective receptor antagonist netupitant. *Inflamm Res*, 2014; 63: 399-409.
- [210] Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012; 2012: 718617.
- [211] Holsapple MP, Trizzino J, Nichols DE, Yim GK. Therapeutic and adjunctive applications of an imidazoline anti-inflammatory agent. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983; 224: 567-571.
- [212] Holzer P, Painsipp E. Differential effects of clonidine, dopamine, dobutamine, and dopexamine on basal and acid-stimulated mucosal blood flow in the rat stomach. *Crit Care Med*, 2001; 29: 335-343.

- [213] Al Masri AA, El Eter E. Agmatine induces gastric protection against ischemic injury by reducing vascular permeability in rats. *World J Gastroenterol*, 2012; 18: 2188-2196.
- [214] Chang CH, Wu HT, Cheng KC, Lin HJ, Cheng JT. Increase of beta-endorphin secretion by agmatine is induced by activation of imidazoline I(2A) receptors in adrenal gland of rats. *Neurosci Lett*, 2010; 468: 297-299.
- [215] Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology*, 1988; 94: 10-21.
- [216] Takeuchi K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E(2) and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. *J Physiol Pharmacol*, 2014; 65: 3-14.
- [217] Aricioglu F, Altunbas H. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 136-140.
- [218] Namiki T, Egawa M, Tominaga S, Inoue S, Takamura Y. Effects of GABA and L-glutamate on the gastric acid secretion and gastric defensive mechanisms in rat lateral hypothalamus. *J Auton Nerv Syst*, 1993; 44: 217-223.
- [219] Gibson DA, Harris BR, Rogers DT, Littleton JM. Radioligand binding studies reveal agmatine is a more selective antagonist for a polyamine-site on the NMDA receptor than arcaine or ifenprodil. *Brain Res*, 2002; 952: 71-77.
- [220] Piletz JE, May PJ, Wang G, Zhu H. Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 64-74.
- [221] Piletz JE, Aricioglu F, Cheng JT, Fairbanks CA, Gilad VH, Haenisch B, Halaris A, Hong S, Lee JE, Li J, Liu P, Molderings GJ, Rodrigues AL, Satriano J, Seong GJ, Wilcox G, Wu N, Gilad GM. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discov Today*, 2013; 18: 880-893.
- [222] Munk SA, Lai RK, Burke JE, Arasasingham PN, Kharlamb AB, Manlapaz CA, Padillo EU, Wijono MK, Hasson DW, Wheeler LA, Garst ME. Synthesis and pharmacologic evaluation of 2-endo-amino-3-exo-isopropylbicyclo[2.2.1]heptane: a potent imidazoline1 receptor specific agent. *J Med Chem*, 1996; 39: 1193-1195.
- [223] Glavin GB, Dugani AM, Pinsky C. L-deprenyl attenuates stress ulcer formation in rats. *Neurosci Lett*, 1986; 70: 379-381.
- [224] Glavin GB. Activity of selective dopamine DA1 and DA2 agonists and

- antagonists on experimental gastric lesions and gastric acid secretion. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 251: 726-730.
- [225] Cross JM, Mercer DW, Gunter J, Miller TA. Effects of dopamine and alpha-2 adrenoreceptor blockade on L-dopa and cholecystokinin-induced gastroprotection. *J Gastrointest Surg*, 1997; 1(3): 257-265.
- [226] Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 2008; 135: 41-60.
- [227] Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Rachmilewitz D. Somatostatin effectively prevents ethanol- and NSAID-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci*, 1994; 39: 617-625.
- [228] Senard JM, Langin D, Estan L, Paris H. Identification of alpha 2-adrenoceptors and non-adrenergic idazoxan binding sites in rabbit colon epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 1990; 191: 59-68.
- [229] Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1986; 279: 324-334.
- [230] Lansdell TA, Hurchla MA, Xiang J, Hovde S, Weilbaecher KN, Henry RW, Tepe JJ. Noncompetitive modulation of the proteasome by imidazoline scaffolds overcomes bortezomib resistance and delays MM tumor growth in vivo. *ACS Chem Biol*, 2013; 8: 578-587.
- [231] Sharma V, Lansdell TA, Peddibhotla S, Tepe JJ. Sensitization of tumor cells toward chemotherapy: enhancing the efficacy of camptothecin with imidazolines. *Chem Biol*, 2004; 11: 1689-1699.
- [232] Kahlon DK, Lansdell TA, Fisk JS, Hupp CD, Friebe TL, Hovde S, Jones AD, Dyer RD, Henry RW, Tepe JJ. Nuclear factor-kappaB mediated inhibition of cytokine production by imidazoline scaffolds. *J Med Chem*, 2009; 52: 1302-1309.
- [233] Furlan R, Ardizzone S, Palazzolo L, Rimoldi A, Perego F, Barbic F, Bevilacqua M, Vago L, Bianchi Porro G, Malliani A. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006; 290: R224-232.



- [234] Bai A, Lu N, Guo Y, Chen J, Liu Z. Modulation of inflammatory response via  $\alpha$ 2-adrenoceptor blockade in acute murine colitis. *Clin Exp Immunol*, 2009; 156: 353-362.
- [235] Bai A, Chen J, Liao W, Lu N, Guo Y. Catecholamine Mediates Psychological Stress-Induced Colitis Through  $\alpha$ 2-Adrenoreceptor. *J Interferon Cytokine Res*, 2015; 35: 580-584.
- [236] Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 2003; 421: 384-388.
- [237] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb j*, 2008; 22: 659-661.
- [238] Yarmohammadi F, Rahimi N, Faghir-Ghanesefat H, Javadian N, Abdollahi A, Pasalar P, Jazayeri F, Ejtemaemehr S, Dehpour AR. Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat. *Eur J Pharmacol*, 2017; 796: 39-44.
- [239] Edwards LP, Brown-Bryan TA, McLean L, Ernsberger P. Pharmacological properties of the central antihypertensive agent, moxonidine. *Cardiovasc Ther*, 2012; 30: 199-208.
- [240] Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG, Wilson VG, Dillon MP. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends Pharmacol Sci*, 1998; 19: 381-390.
- [241] Farsang C. Moxonidine: Clinical Profile. *J Clin Basic Cardiol*, 2001; 4: 17-32.
- [242] Elliott HL. Moxonidine: pharmacology, clinical pharmacology and clinical profile. *Blood Press Suppl*, 1998; 3: 23-27.
- [243] Melgar S, Karlsson L, Rehnstrom E, Karlsson A, Utkovic H, Jansson L, Michaelsson E. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*, 2008; 8: 836-844.
- [244] Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 2017; 23: 6016-6029.

- [245] Zadori ZS, Shujaa N, Brancati SB, Hein L, Gyires K. Both alpha2B- and alpha2C-adrenoceptor subtypes are involved in the mediation of centrally induced gastroprotection in mice. *Eur J Pharmacol*, 2011; 669: 115-120.
- [246] Erdogan Kayhan G, Gul M, Kayhan B, Gedik E, Ozgul U, Kurtoglu EL, Durmus M, Ersoy MO. Dexmedetomidine ameliorates TNBS-induced colitis by inducing immunomodulator effect. *J Surg Res*, 2013; 183: 733-741.
- [247] Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*, 2007; 449: 721-725.
- [248] Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 495-549.
- [249] Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2009; 15: 341-352.
- [250] Park HJ, Kim TW, Seo JN, Oh KI, Choi EY, Shin HS, and Park YE. Effect of Atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, in experimental colitis in mice. *Korean J Pathol*, 2004; 38: 401-407.
- [251] Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K, Blandizzi C. Alpha 2-adrenoceptors in the enteric nervous system: a study in alpha 2A-adrenoceptor-deficient mice. *Br J Pharmacol*, 2002; 135: 697-704.
- [252] Sugawara AM, Miguel TT, Pereira DT, Menani JV, De Luca LA, Jr. Effects of central imidazolinergic and alpha2-adrenergic activation on water intake. *Braz J Med Biol Res*, 2001; 34: 1185-1190.
- [253] Chung HH, Yang TT, Chen MF, Chou MT, Cheng JT. Improvement of hyperphagia by activation of cerebral I(1)-imidazoline receptors in streptozotocin-induced diabetic mice. *Horm Metab Res*, 2012; 44: 645-649.
- [254] Ferrari AC, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, De Luca Junior LA, Menani JV. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. *Brain Res*, 1990; 522: 125-130.
- [255] Ferrari AC, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, Luca Junior LA, Menani JV. Role of the alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the

- dipsogenic response to central angiotensin II in rats. *Brain Res*, 1991; 560: 291-296.
- [256] Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, de Andrade CA, da Silva DC, Renzi A, De Luca LA, Jr. Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull*, 1999; 49: 273-279.
- [257] Bing C, King P, Pickavance L, Brown M, Ziegler D, Kaan E, Williams G. The effect of moxonidine on feeding and body fat in obese Zucker rats: role of hypothalamic NPY neurones. *Br J Pharmacol*, 1999; 127: 35-42.
- [258] Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi R, Sutton J, Eglen RM. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol*, 1997; 122: 1339-1344.
- [259] Moser B. CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Front Immunol*, 2015; 6: 296.
- [260] Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D, Cerami A. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med*, 1988; 168: 2251-2259.
- [261] Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; 86: 612-616.
- [262] Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med*, 2005; 26: 379-390.
- [263] von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 2000; 47: 63-73.
- [264] Jakubowska K, Pryczynicz A, Iwanowicz P, Niewinski A, Maciorkowska E, Hapanowicz J, Jagodzinska D, Kemon A, Guzinska-Ustymowicz K. Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and Their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterol Res Pract*, 2016; 2016: 2456179.

- [265] Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, Rovedatti L, Docena G, Monteleone G, Rampton DS, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology*, 2007; 133: 137-149.
- [266] Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, Baschiera F, Barbara G, De Giorgio R, De Ponti F, Breschi MC, Del Tacca M. Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by alpha2-adrenoceptors in the presence of experimental colitis. *Br J Pharmacol*, 2003; 139: 309-320.
- [267] Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol*, 1990; 145: 1430-1434.
- [268] Tack J. Gastric motor disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2007; 21: 633-644.
- [269] Tack J, Piessevaux H, Coulie B, Caenepeel P, Janssens J. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterology*, 1998; 115: 1346-1352.
- [270] Hausken T, Stene-Larsen G, Lange O, Aronsen O, Nerdrum T, Hegbom F, Schulz T, Berstad A. Misoprostol treatment exacerbates abdominal discomfort in patients with non-ulcer dyspepsia and erosive prepyloric changes. A double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Scand J Gastroenterol*, 1990; 25(10):1028-1033.
- [271] Greydanus MP, Vassallo M, Camilleri M, Nelson DK, Hanson RB, Thomforde GM. Neurohormonal factors in functional dyspepsia: insights on pathophysiological mechanisms. *Gastroenterology*, 1991; 100: 1311-1318.
- [272] Kaliszan W, Petruszewicz J, Kaliszan R. Imidazoline receptors in relaxation of acetylcholine-constricted isolated rat jejunum. *Pharmacol Rep*, 2006; 58: 700-710.
- [273] Wittmann T, Kiss F, Izbeki F, Rosztoczy AI, Varkonyi TT, Roka R, Lonovics J. Improvement of gastric emptying in patients with diabetic gastroparesis by moxonidine. *Gastroenterology*, 2003; 124: 222-223.
- [274] Asai T, Vickers MD, Power I. Clonidine inhibits gastric motility in the rat. *Eur J Anaesthesiol*, 1997; 14: 316-319.

- [275] Liu L, Coupar IM. Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the effects of moxonidine on intestinal motility and fluid transport. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997; 283: 1367-1374.
- [276] Herman MA, Niedringhaus M, Alayan A, Verbalis JG, Sahibzada N, Gillis RA. Characterization of noradrenergic transmission at the dorsal motor nucleus of the vagus involved in reflex control of fundus tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008; 294: R720-729.
- [277] Trendelenburg AU, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K. All three alpha2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003; 368: 504-512.
- [278] Hudson AL, Gough R, Tyacke R, Lione L, Lalies M, Lewis J, Husbands S, Knight P, Murray F, Hutson P, Nutt DJ. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 881: 81-91.
- [279] Halaris A, Plietz J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs*, 2007; 21: 885-900.
- [280] Aricioglu F, Ercil E, Dulger G. Agmatine inhibits naloxone-induced contractions in morphine-dependent Guinea pig ileum. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 1009: 147-151.
- [281] Alemany R, Olmos G, Garcia-Sevilla JA. Labelling of I2B-imidazoline receptors by [3H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) in rat brain and liver: characterization, regulation and relation to monoamine oxidase enzymes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997; 356: 39-47.
- [282] Hudson AL, Chapleo CB, Lewis JW, Husbands S, Grivas K, Mallard NJ, Nutt DJ. Identification of ligands selective for central I2-imidazoline binding sites. *Neurochem Int*, 1997; 30: 47-53.

## **10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### A doktori értekezéssel összefüggő publikációk jegyzéke:

Feher A, Toth VE, Al-Khrasani M, Balogh M, Lazar B, Helyes Z, Gyires K, Zadori ZS. Analysing the effect of I1 imidazoline receptor ligands on DSS-induced acute colitis in mice. *Inflammopharmacology*, 2017; 25: 107-118. [IF: 3.304]

Gyires K, Feher A. Stress, Neuropeptides and Gastric Mucosa. *Curr Pharm Des*, 2017; 23: 3928-3940. [IF: 2.757]

Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Al-Khrasani M, Puskar Z, Kozsurek M, Timar J, Tabi T, Helyes Z, Hein L, Holzer P, Gyires K. Inhibition of alpha2A-Adrenoceptors Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Intestinal Inflammation in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016; 358: 483-91.201 [IF: 3.867]

Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Philipp K, Nemeth J, Gyires K. Evidence for the gastric cytoprotective effect of centrally injected agmatine. *Brain Res Bull*, 2014; 108: 51-9. [IF: 2.718]

Zadori ZS, Feher A, Al-Khrasani M, Lacko E, Toth VE, Brancati SB, Hein L, Matyus P, Gyires K. Imidazoline versus alpha(2)-adrenoceptors in the control of gastric motility in mice. *Eur J Pharmacol*, 2013; 705: 61-7. [IF: 2.684 ]

### A doktori értekezéssel nem összefüggő publikációk jegyzéke:

Toth VE, Feher A, Nemeth J, Gyertyan I, Zadori ZS, Gyires K. Modulation of central endocannabinoid system results in gastric mucosal protection in the rat. *Brain Res Bull*, 2018; 139: 224-234. [IF: 3.44]

Zador F, Kiraly K, Varadi A, Balogh M, Feher A, Kocsis D, Erdei AI, Lacko E, Zadori ZS, Hosztafi S, Noszal B, Riba P, Benyhe S, Furst S, Al-Khrasani M. New opioid receptor

antagonist: Naltrexone-14-O-sulfate synthesis and pharmacology. Eur J Pharmacol, 2017; 809: 111-121. [IF: 3.04 ]

Zadori ZS, Feher A, Toth VE, Al-Khrasani M, Koles L, Sipos S, Del Bello F, PIGINI M, Gyires K. Dual Alpha2C/5HT1A Receptor Agonist Allyphenylene Induces Gastroprotection and Inhibits Fundic and Colonic Contractility. Dig Dis Sci, 2016; 61: 1512-23. [IF: 2.875 ]

Könyvfejezet:

Gyires K, Feher A. Brain–Gut Relationship on Mucosal Inflammation in the Gastrointestinal Tract. Therapeutic Targets for Inflammation and Cancer: Novel Therapies for Digestive Diseases. 460 p. Singapore: World Scientific, 2017. pp. 7-32.

## **11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A doktori munkám során részletezett kísérleteket a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmatoterápiás Intézetében végeztem.

Ezúton szeretném megköszönni a segítséget és a támogatást:

Dr. Zádori Zoltánnak, témavezetőmnek, aki bevezetett a farmakológia mélységeibe, és munkám során végig a segítségemre volt;

Prof. Dr. Gyires Klárának, a munkacsoportunk vezetőjének, aki a szakmai fejlődésemet mindvégig elősegítette tanácsaival és támogatásával;

Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, aki intézetvezetőként lehetővé tette, hogy doktori munkámat az intézetben végezhessem;

Dr. Al-Khrasani Mahmoudnak, aki a kísérleteim során számos értékes tanácsot adott;

Prof. Dr. Németh Józsefnek, és munkatársainak, akik a kísérleteimhez a SOM és CGRP szinteket meghatározták;

Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának és munkatársainak, Dr. Puskár Zitának és munkatársainak, akik a kísérletemhez a szövettani metszeteket elkészítették;

Dr. Tóth Viktóriának, Dr. Balogh Mihálynak, Szalai Istvánnának, Molnárné Péntes Máriának és Pol-Maruzs Veronikának a kísérletekben nyújtott segítségüket;

Az intézet összes dolgozójának, akik a doktori munkám létrejöttében segítettek;

és végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak a türelmükért és a támogatásukért.

A kutatás az OTKA PD 109602, a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010 és az OMAA 84öu6 projekt keretében valósult meg.